



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

INFORME DE PASANTÍA

Licenciatura en Biología Humana

Potencial efecto anticarcinogénico del extracto de pitanga (*Eugenia uniflora*)

Br. Macarena Menoni

Facultad de Ciencias

Tutora: Dra. Deborah J. Keszenman

Laboratorio de Radiobiología Médica y Ambiental,
PDU de Biofísicoquímica, Dpto. de Ciencias
Biológicas, CENUR Litoral Norte, UdelaR.

2021

AGRADECIMIENTOS

- Un especial agradecimiento a mi tutora, la Dra. Deborah J. Keszenman docente del Laboratorio de Radiobiología Médica y Ambiental por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto y poder realizar esta pasantía, enseñarme y acompañarme en el proceso, su disposición y tiempo dedicado.
- Agradezco también al Dr. R. Daniel Peluffo, jefe del Laboratorio de Biofísicoquímica del CENUR Litoral Norte, por brindarme la oportunidad y el espacio para realizar la parte experimental de mi pasantía final de grado en su laboratorio.
- A los compañero/as del laboratorio de Biofísicoquímica por aceptarme en su grupo de investigación, por su continua disposición para enseñarme y acompañarme en cada etapa de este trabajo.
- A mi familia y a cada una de las personas que estuvo presente durante este proyecto y a lo largo de toda la carrera, por el apoyo y estímulo constante. Finalmente, un agradecimiento especial a mi hijo por entender todas mis horas de ausencia y esperarme siempre con una sonrisa.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Antecedentes	7
2.2 Cáncer colorrectal: su importancia en Uruguay	7
2.3 Aspectos clínicos del CCR: etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento... 9	
2.4 Prevención, terapias complementarias y alternativas en el CCR.....	11
2.5 Usos de productos naturales derivados de plantas para el cuidado de la Salud.....	12
2.6 <i>Eugenia uniflora</i>	14
2.6.1 Caracterización botánica	14
2.6.2 Distribución geográfica y usos tradicionales de <i>Eugenia uniflora</i> . 15	
2.6.3 Usos y propiedades de <i>Eugenia uniflora</i>	16
2.7 Significancia de la investigación.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.3 OBJETIVOS ACADÉMICOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Antecedentes de usos medicinales de <i>Eugenia uniflora</i> (Objetivo específico 1)	19
4.2 Producción de extracto de hoja de <i>Eugenia uniflora</i> (Objetivo específico 2) 20	
4.2.1 Identificación y localización del material vegetal	20
4.2.2 Efecto citotóxico del AE de Pitanga en cultivos de células humanas de colon (Objetivo específico 3).....	23
4.2.3 Líneas celulares humanas de colon.....	23
4.2.4 Condiciones de cultivo, subcultivo y mantenimiento de líneas celulares:	25
4.2.5 Evaluación de efecto citotóxico del AE sobre las líneas celulares 26	
4.3 Evaluación del efecto antiproliferativo del AE sobre las líneas celulares (Objetivo específico 4)	29
4.3.1 Estudio de la cinética de proliferación de las líneas celulares CCD 841 CoN y Caco-2, con y sin AE	29
4.4 Análisis estadístico.....	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Revisión bibliográfica y entrevista	32

5.2	Producción del extracto de hojas de <i>Eugenia uniflora</i>	39
5.3	Determinación del efecto citotóxico del AE sobre las líneas celulares	41
5.4	Estudio de la cinética de proliferación de ambas líneas celulares	46
6.	DISCUSIÓN	52
6.1	Las propiedades beneficiosas para la salud de las hojas de pitanga son de conocimiento popular. Investigación en una muestra de pobladores adultos del Departamento de Salto	52
6.2	Recolección de material vegetal y preparación del extracto de hojas de <i>Eugenia uniflora</i> a utilizar en los ensayos <i>in vitro</i> . Selección de ejemplar de la especie y consideraciones ambientales	55
6.3	Propiedades anticarcinogénicas del aceite esencial de hojas de pitanga: efectos citotóxicos y antiproliferativos en células normales y tumorales de colon humano.....	57
7.	CONCLUSIONES.....	61
8.	PERSPECTIVAS	62
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
10.	APÉNDICE 1	68

1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad crónica de alto impacto en la salud de la población mundial, constituyendo la segunda causa de muerte en Uruguay. En particular, en nuestro país el cáncer colorrectal constituye un importante problema de salud pública y si bien, toda la población posee cobertura de salud, no necesariamente cuenta con una atención integral. Este es un motivo por el cual muchas veces la población recurre a la medicina tradicional como una posible alternativa (única o combinada con la medicina convencional) para tratar sus dolencias. De hecho, aproximadamente 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional y productos naturales para los cuidados de salud. En nuestra región es frecuente el uso de plantas nativas para la preparación de infusiones y extractos cuyas propiedades medicinales aún no han sido suficientemente estudiadas. *Eugenia uniflora*, también conocida como pitanga, es una planta nativa de Uruguay ampliamente utilizada en la medicina tradicional y de la cual se han descrito algunos usos como antidiarreico, diurético, antiinflamatorio entre otros. El objetivo de este trabajo fue conocer los usos que la población hace de las hojas de *Eugenia uniflora*, principalmente con fines medicinales, y estudiar efectos biológicos potencialmente anticarcinogénicos (citotóxico y antiproliferativo) del aceite esencial (AE) en líneas celulares de colon normal y tumoral. La hipótesis de investigación del estudio propone que en base a los usos tradicionales reportados de *Eugenia uniflora*, el AE producido a partir de la hoja de pitanga puede presentar propiedades anticarcinogénicas con potencial uso quimiopreventivo y/o terapéutico del cáncer colorrectal. Con el objetivo de conocer sobre los usos tradicionales de las hojas de pitanga se realizaron entrevistas de carácter informal a una muestra de la población del departamento de Salto. Para investigar los potenciales efectos biológicos anticarcinogénicos del AE de hojas de pitanga se procedió inicialmente a la preparación del AE a partir de un ejemplar vegetal caracterizado mediante hidrodestilación. Utilizando el AE obtenido se estudió el efecto citotóxico de distintas concentraciones del AE sobre células humanas normales CCD 841 CoN y tumorales Caco-2 de colon mediante análisis de sobrevivencia con el ensayo con MTT complementado con el ensayo de viabilidad celular por la técnica de exclusión de Trypan Blue. Para evaluar el efecto antiproliferativo se determinó y analizó en ambas líneas celulares la de cinética de proliferación en presencia y

ausencia del AE, así como la viabilidad celular durante la proliferación. La información obtenida a través de las entrevistas demuestra que *Eugenia uniflora* es una especie ampliamente conocida en el territorio y sus hojas son empleadas por la población en diversos preparados como medicina alternativa para tratar síntomas digestivos, diarrea, hipertensión y tos entre otros trastornos de la salud. En relación a los efectos biológicos, se evidenciaron efectos letales del AE, dosis dependiente en ambas líneas celulares, siendo la línea CCD841CoN resistente a bajas dosis. Mediante el análisis cinético se observó enlentecimiento de la proliferación producido por el AE en la línea tumoral Caco-2, mientras que no se modificó la viabilidad celular. En cambio, en la línea celular normal CCD841CoN el AE determinó la ausencia de proliferación y pérdida de viabilidad. En suma, en las células humanas colónicas tumorales el AE de pitanga produjo letalidad y disminución de la proliferación mientras que en las células normales no se evidenció efecto citotóxico a bajas dosis del AE, pero sí un claro efecto antiproliferativo. Nuestros resultados sustentan el posible efecto anticarcinogénico del AE de hojas de *Eugenia uniflora*. Surge así la posibilidad de considerar este AE como una fuente de agentes químicos con posible aplicación quimiopreventiva y/o quimioterapéutica del cáncer colorrectal.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, *Eugenia uniflora*, medicina tradicional.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (OMS, 2021). El mismo constituye una patología compleja y multisistémica afectando cualquier parte del organismo. En el año 2020 se diagnosticaron más de 19 millones de casos nuevos y se registraron casi 10 millones de muertes debidas al cáncer en todo el mundo (GLOBOCAN, 2020). Entre los tipos más comunes de cáncer se hallan el cáncer pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario, siendo los mismos los responsables del mayor número de muertes por esta patología (OMS, 2021). En la **Figura 1** se presentan las cifras de nuevos casos para estos tipos de neoplasias en ambos sexos y todas las edades reportadas en el año 2020.

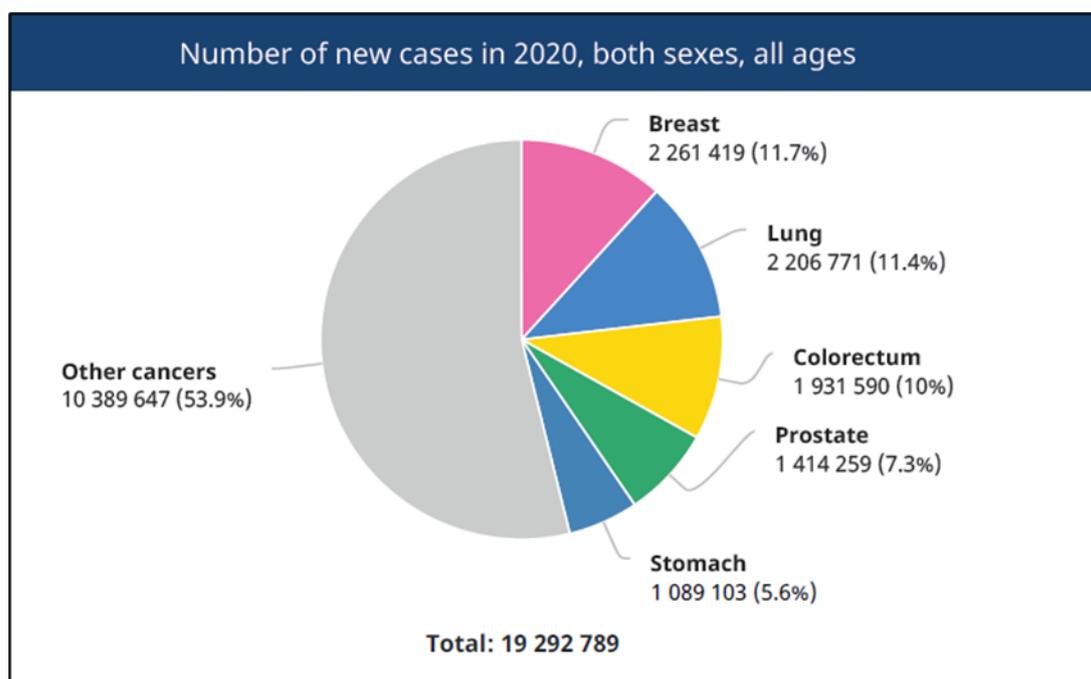


Figura 1. Número de nuevos casos a nivel mundial durante el año 2020 (GLOBOCAN, 2020).

2.2 Cáncer colorrectal: su importancia en Uruguay

El cáncer colorrectal (CCR) se refiere a tumores malignos localizados en el intestino pudiendo estar en el colon o en el recto. En la actualidad es un problema importante por su alta incidencia y alta mortalidad en humanos, representando aproximadamente el 10% del total de los cánceres diagnosticados a nivel mundial durante el año 2020 (**Figura 1**) (GLOBOCAN, 2020).

En Uruguay el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en incidencia entre todas las neoplasias para el sexo masculino mientras que se ubica en el segundo lugar para el sexo femenino. A su vez se constituye como la segunda causa de mortalidad por cáncer si reunimos ambos sexos. En la **figura 2** podemos observar que solamente durante el año 2020, se registraron 1.096 nuevos casos de CCR en varones y 1.027 nuevos casos en mujeres (GLOBOCAN, 2020).

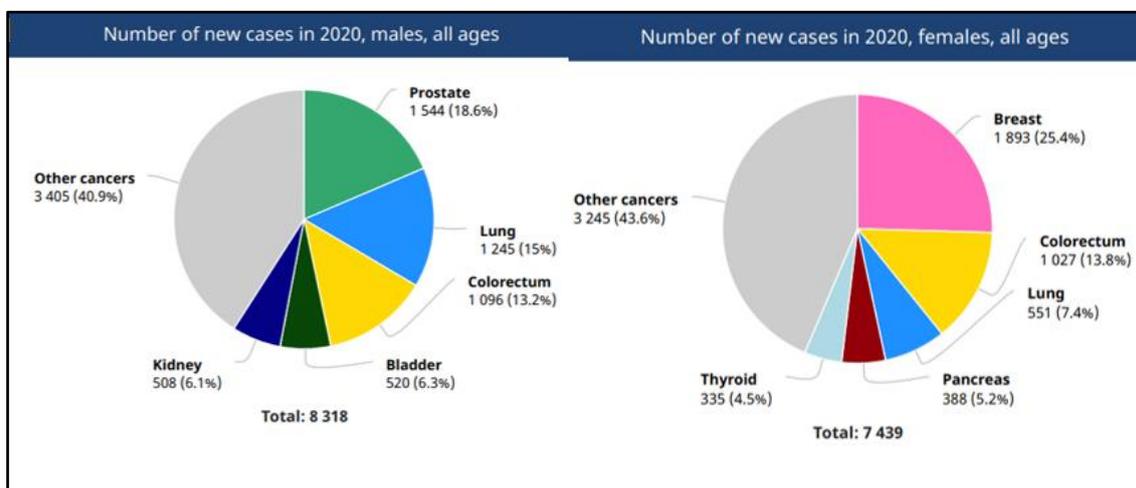


Figura 2. Número de casos nuevos de cáncer en Uruguay durante el 2020, por sexo (GLOBOCAN, 2020).

Una particularidad que puede observarse en Uruguay respecto al CCR, si observamos los mapas de distribución de la patología en el territorio del país, es su inhomogénea distribución geográfica. Si comparamos la incidencia del CCR en la capital del país y los departamentos del interior, los datos muestran que poco menos de la mitad de los casos (46.9 %) se concentran en el departamento de Montevideo, mientras que el resto de los casos se distribuyen en el resto del territorio (53.1 %) (Barrios et al., 2020). Al considerar los departamentos ubicados al norte del Río Negro (Artigas, Salto, Paysandú, Rivera, Tacuarembó y Río Negro) se aprecia que la mayor incidencia del CCR para el sexo masculino se encuentra en el departamento de Tacuarembó, mientras que, si consideramos la incidencia para el sexo femenino, la mayoría se concentra en el departamento Río Negro, seguido por el departamento de Paysandú (**Figura 3**) (CHLCC,2021). Finalmente, el análisis de incidencia intradepartamental indica que la mayor incidencia del CCR, para todos los departamentos antes mencionados, se encuentra en las ciudades, siendo baja la incidencia en las zonas rurales donde en su mayoría no supera el 10 % (Barrios et al., 2020). Por tanto, el CCR representa para Uruguay un importante problema de Salud Pública, situación

que amerita atención, así como la implementación de medidas destinadas a prevenir, detectar en forma precoz y tratar adecuadamente dicho cáncer (MSP, 2018; Barrios & Garau, 2017).

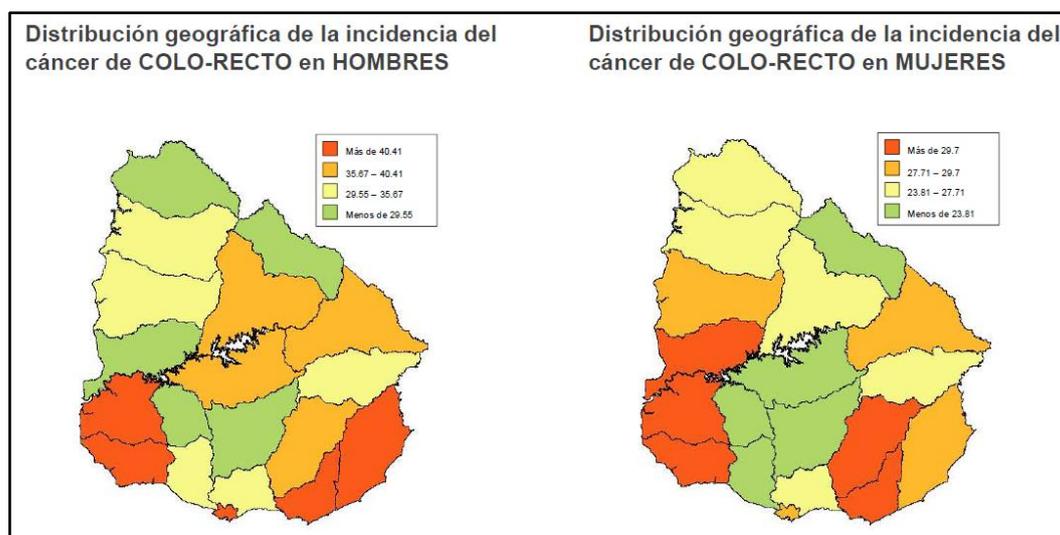


Figura 3. Distribución de la incidencia del cáncer colorrectal en el territorio uruguayo (CHLCC, 2021).

2.3 Aspectos clínicos del CCR: etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento

La mayoría de los cánceres colorrectales, independientemente de su etiología, derivan de pólipos adenomatosos preexistentes. Estas protuberancias, en ocasiones visibles macroscópicamente en la superficie de la mucosa del colon o del recto, pueden poseer potencial de malignidad, que con el paso del tiempo y debido a la acción de múltiples factores loco-regionales y generales del organismo evolucionan a un tumor maligno (AECC, 2002).

En los últimos años se ha progresado en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer colorrectal. Si bien su etiología es muy heterogénea, muchos estudios han identificado tanto factores externos o del ambiente, así como también genéticos vinculados al desarrollo de este tipo de cáncer (Blanco et al., 2005). Un pequeño porcentaje de los casos de CCR se asocian a formas hereditarias como la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), enfermedad que se caracteriza por el desarrollo de gran número de pólipos adenomatosos en la zona del colon y el recto, a partir de los cuales y sin mediar tratamiento predisponen al desarrollo de CCR (Parés et al., 2006). Otro tipo de CCR vinculado a factores hereditarios es el cáncer colorrectal no poliposis o Síndrome de Lynch el cual se corresponde con modificaciones patogénicas en

alguno de los genes que intervienen en la reparación de errores durante la replicación del ADN o Mismatch Repair (MMR) (Castro & Barletta, 2018). Salvo en los casos vinculados al CCR hereditario, la causa exacta de la aparición de tumores malignos en colon y recto se desconoce siendo el proceso de la carcinogénesis y tumorogénesis un fenómeno complejo y multifactorial (Tume-Farfán, 2014).

Muchas investigaciones reconocen un conjunto de factores de riesgo, es decir, características, exposiciones o conductas de la persona que aumentan la probabilidad de que ésta sufra una lesión o patología, además de los hereditarios (Tafani et al., 2013). Tales factores además de la exposición a agentes carcinogénicos químicos o físicos incluyen de una manera preponderante el consumo de una dieta rica en grasas y proteínas y pobre en fibra, frutas y vegetales. También se han descrito otros factores de riesgo de padecer CRR relacionados con el estilo de vida como es el consumo excesivo de tabaco y alcohol, y nula o escasa actividad física. En cuanto a la edad, tanto la incidencia como la mortalidad del CCR varía en función de la misma, pero se observa un notorio incremento de éstas a partir de los 50 años de edad (Guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal, 2009).

Desde el punto de vista clínico, además de la sintomatología característica de la enfermedad tumoral como son el cansancio extremo y la pérdida de peso sin razón aparente, los signos y síntomas del CRR dependen de la localización del tumor siendo los más frecuentes las manifestaciones digestivas como son el sangrado en las heces, la alteración en el ritmo de las deposiciones, heces más estrechas, sensación de evacuación incompleta y el dolor abdominal (AECC, 2002).

El tratamiento para cada paciente es definido de manera individual teniendo en consideración factores que involucran el estado general del individuo, el estadio de la enfermedad y la localización del tumor. Por lo tanto, existen diversas opciones de tratamientos que pueden aplicarse aislados o más frecuentemente combinados. La cirugía se presenta como primera opción, con el objetivo de extirpar el tumor, pero también se utilizan la quimioterapia o la radioterapia (Calva, 2009).

2.4 Prevención, terapias complementarias y alternativas en el CCR

El conocimiento de la existencia de factores de riesgo del CCR ha permitido que en los últimos años se aconseje adoptar diferentes medidas higiénico dietéticas para prevenir o retrasar la aparición de tumores colorrectales. Las recomendaciones incluyen consumir una dieta rica en fibras, sobre todo vegetales y frutas, disminuir el consumo de carnes rojas y grasas de origen animal, consumir alimentos ricos en calcio (lácteos), evitar el consumo de tabaco y reducir la ingesta de alcohol (INC, 2015). Adicionalmente, algunos estudios indican que el consumo de vitamina D puede estar asociado a una disminución del riesgo de padecer CCR (Casimiro, 2002) y, de hecho, la Organización Mundial de la Salud ha propuesto al CCR como el tipo de cáncer con mayor riesgo asociado a un déficit de vitamina D (Guía Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal, 2018). La forma activa de la vitamina D (colecalfiferol) desarrolla un papel importante en la regulación de la proliferación y regulación celular, además de estar involucrada en el metabolismo del calcio (Casimiro, 2002).

También existen las terapias complementarias a los tratamientos convencionales de cirugía, quimio o radioterapia las cuales consisten en tratamientos que se usan en conjunto con el tratamiento convencional indicado por el médico tratante y pueden incluir desde vitaminas hasta hierbas. Generalmente se recurren a este tipo de terapia con el fin de evitar o amortiguar los efectos secundarios que resultan de los tratamientos convencionales como la quimioterapia, como vómitos, diarrea y cansancio. (American Cancer Society, 2015).

Se ha evidenciado que muchos alimentos y plantas contienen sustancias beneficiosas para la salud y pueden tener potencial uso en tratamientos

oncológicos. Dentro de las principales plantas utilizadas para el tratamiento complementario del cáncer podemos encontrar la Cúrcuma (*Curcuma longa*) (Alvarado, 2020; Juanbeltz et al., 2017), Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Loli Ponce et al., 2018; Juanbeltz et al., 2017), Sábila (*Aloe vera*) por su potencial como antioxidante y beneficios para la rápida cicatrización de lesiones, Manzanilla (*Chamaemelum nobile*) por poseer componentes químicos con propiedades anticancerígenas (Alvarado, 2020; Loli Ponce et al. 2018), Jengibre (*Zingiber officinale*) (Juanbeltz et al., 2017) por su utilidad para tratar los vómitos que se presentan luego de la quimioterapia; y el té verde (*Camellia Sinesis*) como antioxidante (Alvarado, 2020).

En la búsqueda de posibles terapias alternativas para la prevención y el tratamiento del CCR se han realizado estudios con diversos productos naturales que derivan de plantas. Por ejemplo, se han descrito las propiedades antineoplásicas de la salvia (*Salvia officinalis*) como supresor y quimioprotector del cáncer de colon (Luca et al., 2020); los efectos de extractos de semillas de uva contra las líneas celulares de cáncer colorrectal (Derry et al., 2013) y la actividad antitumoral de un extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en modelos *in vivo* e *in vitro* de CCR (Pérez, 2017).

2.5 Usos de productos naturales derivados de plantas para el cuidado de la Salud

En la actualidad un gran porcentaje de las poblaciones de los países en desarrollo como Uruguay, donde el acceso a la medicina “moderna” se encuentra muchas veces limitado por factores tanto económicos como culturales, recurren a la denominada medicina tradicional, también denominada popular o folklórica, como alternativa o complemento a la medicina convencional, para tratar diversas dolencias (Correa, 2002). La medicina tradicional hace referencia a la suma de todos los conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OPS/OMS, 2002).

El uso de productos naturales, como las plantas, fue descrito a lo largo de la historia. Se han utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de múltiples

enfermedades y no son más que el resultado de la experimentación del hombre, por ensayo y error, en la búsqueda de alimentos útiles para el tratamiento de las enfermedades (Días et al., 2012).

En la población uruguaya existe un amplio uso tradicional de plantas como medicina. Existe la costumbre popular de elaborar preparados con plantas dentro del ámbito doméstico a partir de los cuales no solo se atienden afecciones y síntomas simples como resfríos, afecciones respiratorias, digestivas, cutáneas, etc., sino también afecciones crónicas como procesos inflamatorios e infecciosos de diversa índole, incluso el cáncer (Red de plantas medicinales de América del Sur, 2005). Dado que nuestros antepasados masticaron ciertas hierbas para aliviar el dolor o envolvieron las hojas alrededor de las heridas para mejorar la curación, a lo largo de nuestra evolución, la importancia de los productos naturales para la medicina y la salud ha sido enorme (Ji, 2009). Las plantas medicinales forman parte del acervo cultural de una población y constituyen actualmente una riqueza que debe ser resguardada para nuestro beneficio y el de las generaciones futuras (Red de plantas medicinales de América del Sur, 2005). Cabe mencionar que, en el marco del Convenio de 1992 sobre Diversidad Biológica, Uruguay es uno de los países que ha firmado el Protocolo de Nagoya del 2014. Este acuerdo complementario al Convenio mencionado establece obligaciones para tomar medidas en relación con el acceso a los recursos genéticos naturales, así como la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de su utilización (Keszenman y German, 2018). Parte de importancia de este acuerdo se debe a que entre estos recursos genéticos están las plantas medicinales las cuales pueden ser comercializadas indiscriminadamente llegando a producir entre otros problemas ambientales (extracción excesiva) y producción de productos supuestamente medicinales sin control de calidad ni de distribución.

Si bien varias terapias con medicina tradicional son potencialmente beneficiosas, muchas no han sido probadas científicamente. De hecho, una amplia diversidad de plantas, frutos y semillas o sus derivados son utilizados en la medicina tradicional y se han reportado que sus componentes presentan efectos favorables para la salud. Un ejemplo es la planta de cannabis de la cual existen evidencias para su uso como antiemético, analgésico y antiepiléptico entre otros (Notejane et al. 2018). Por este motivo, en los últimos años se ha

visto renovado el interés por el uso de compuestos naturales y profundizar en el conocimiento de los efectos producidos por las plantas o sus productos en la salud humana (Ji, 2009). Todo esto se debe a que las plantas sintetizan en pequeñas proporciones diversos compuestos químicos como alcaloides, esteroides, fenoles, entre muchos otros. Estas sustancias poseen diferentes propiedades biológicas, motivo por el cual muchas de ellas son empleadas en industria farmacéutica como principios activos de múltiples fármacos. Así mismo, han servido de modelo para el diseño de compuestos sintéticos que facilitan y en ocasiones reducen los costos de producción de ciertas medicinas, además de generar compuestos con mayor eficacia clínica (Waizel- Bucay, 2010). Afortunadamente, hoy en día contamos con avanzadas técnicas que nos permiten purificar e identificar dichos compuestos, y también con rápidos ensayos biológicos desarrollados *in vitro* y de forma automatizada que nos permiten detectar su actividad farmacológica, facilitando y acelerando la búsqueda de medicamentos (Barquero, 2007). Algunos ejemplos muy conocidos de medicamentos que proceden de la naturaleza son la aspirina, cuyo principio activo, el ácido acetilsalicílico, procede de la corteza del sauce (Waizel-Bucay, 2010); la morfina, un potente analgésico obtenido de la Adormidera (*Papaver somniferum* L) y la Vincristina, antitumoral procedente de la planta llamada Vincapervinca (*Catharanthus roseus*) (Farnsworth et al., 1989). Es indudable que la naturaleza se constituye como la mejor y amplia fuente de medicamentos (Rayan et al., 2017).

2.6 *Eugenia uniflora*

Entre las plantas de uso medicinal popular se encuentra *Eugenia uniflora*. Su nombre deriva de *Eugenia* en honor al príncipe Eugene de Saboya (1663-1736), *uniflora* significa con una sola flor, por sus flores solitarias. Es también comúnmente conocida como pitanga; una especie de la familia Myrtaceace nativa de Uruguay (Red de plantas medicinales de América del Sur, 2005).

2.6.1 Caracterización botánica

Es una especie de árboles pequeños de 4 a 6 m de altura, de hojas generalmente ovadas en ramillas y muy aromáticas, característica que identifica a esta especie. Esta fructifica desde finales de primavera hasta mediados del verano. Los frutos tienen forma de bayas globosas con 6 a 8 costillas con

variedad de colores, anaranjados, rojos, púrpuras, negruzcos, muy brillantes y de sabor ligeramente ácido (**Figura 4**). Posee flores de corolas blancas dispuestas sobre pedúnculos unifloros, largos de 2 a 3 cm de longitud y muy delgados (Vignale et al., 2018).



Figura 4. Ejemplar de *Eugenia uniflora*. Imagen obtenida Online de <https://www.argentinat.org/taxa/83642-Eugenia-uniflora>

2.6.2 Distribución geográfica y usos tradicionales de *Eugenia uniflora*

Es una especie comúnmente encontrada en zonas tropicales y subtropicales del noreste de Argentina, Uruguay y Brasil. En Uruguay era habitualmente hallada en los bordes de los ríos, pero actualmente se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del territorio. Además, debido a su alta capacidad de adaptación a las más variadas condiciones ambientales, la Pitanga ha logrado ser introducida en diferentes regiones de las Américas (**Figura 5**) (Vignale et al., 2018).

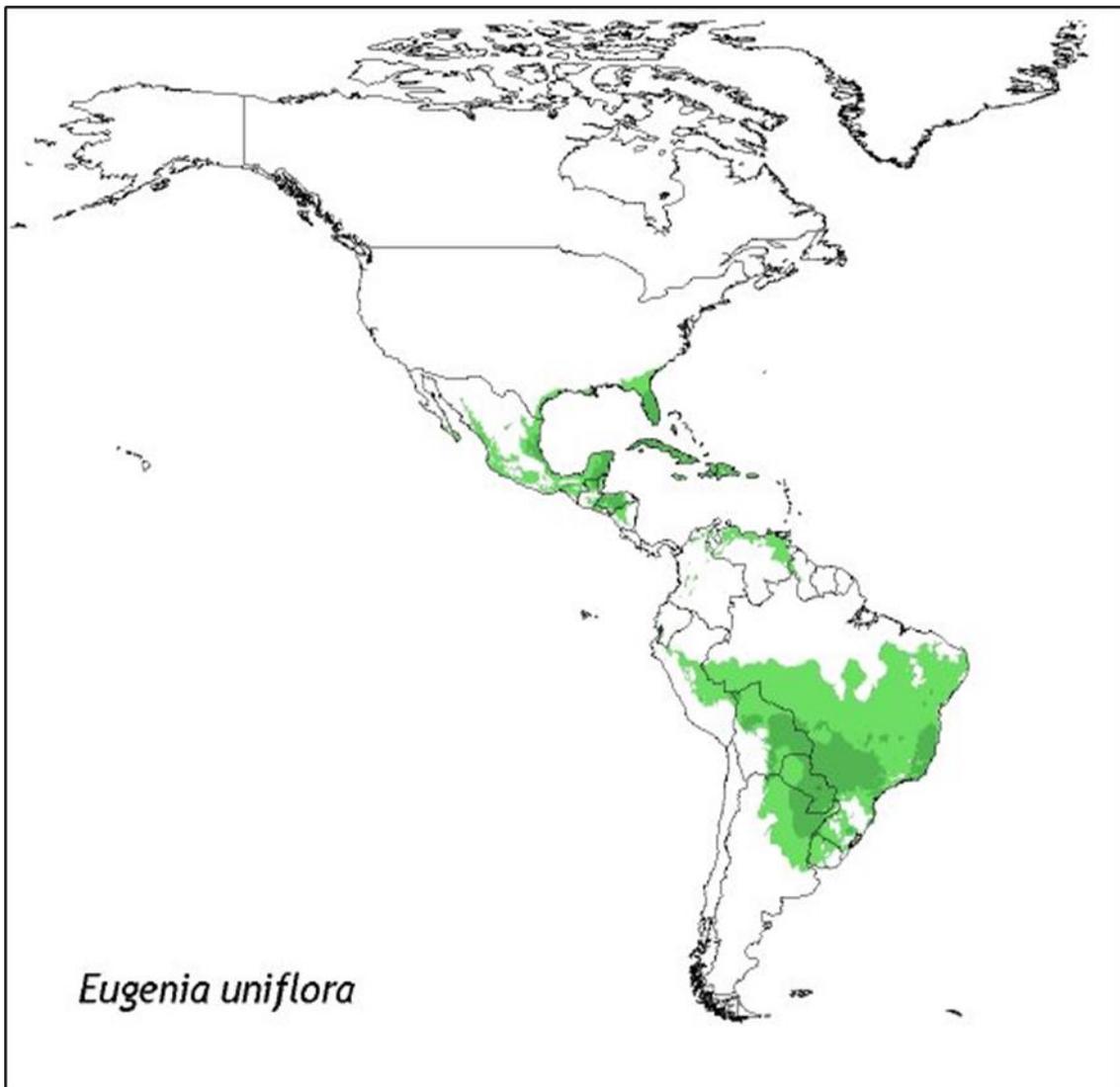


Figura 5. Distribución geográfica de *Eugenia Uniflora* en las Américas.

https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRjn2CkgxYQ5s_NKD8UGDx_DW eTbQtweyWmPg60d1S4IPA8N8wo&usqp=CAU

2.6.3 Usos y propiedades de *Eugenia uniflora*

En Uruguay y zonas próximas de Argentina y Brasil, los frutos de pitanga han sido tradicionalmente usados como aditivos a bebidas alcohólicas destiladas (caña con Pitanga) (**Figura 6**), licores o consumidos ocasionalmente como frutas. Sus hojas han sido utilizadas desde la época colonial en forma de infusión por sus propiedades diuréticas, digestivas, antidiarreicas, antirreumáticas, antihipertensivas y antiinflamatorias entre otras (Vignale et al., 2018; González et al., 2018). Además, en diversas investigaciones se han descrito usos de *Eugenia uniflora*, a nivel molecular y celular, debidos a su actividad antibacteriana, actividad antifúngica y actividad antioxidante (Queiroz et al., 2015).



Figura 6. Botella caña con pitanga Los yuyos, restaurante uruguayo.

<http://www.retrovisiones.com/2014/05/la-foto-del-dia-si-tomas-manejes/>

2.7 Significancia de la investigación

Partiendo del conocimiento de los usos medicinales tradicionalmente atribuidos a las hojas de *Eugenia uniflora*, planteamos como hipótesis que éstas podrían poseer potencial utilidad quimiopreventiva y/o terapéutica para el CRR debido a sus propiedades digestivas y antiinflamatorias. Por esta razón, es interesante por un lado investigar el uso tradicional de las hojas de pitanga y la frecuencia de su uso en la población uruguaya tomando una muestra de población residente en el departamento de Salto. Por otro lado, en la búsqueda de un posible nuevo agente antineoplásico y dadas las propiedades biológicas descritas hasta el presente se propone profundizar en el estudio de los efectos celulares de los extractos de pitanga utilizando aceite esencial preparado a partir de hojas de pitanga. Para ello, se plantea determinar la posible actividad antiproliferativa y/o citotóxica del extracto usando células tumorales de colon como modelo celular *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar y conocer sobre los usos que se le da a la hoja de pitanga (*Eugenia uniflora*) en la medicina folklórica o tradicional e investigar los efectos letales y antiproliferativos del aceite esencial (AE) de pitanga sobre líneas celulares de colon.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Investigar sobre los usos culturales atribuidos a las hojas de pitanga en Uruguay, principalmente como antiinflamatorio del tracto gastrointestinal.

2) Producir aceite esencial de pitanga a partir de un ejemplar de *Eugenia uniflora* seleccionado por clonación.

3) Determinar los efectos de citotoxicidad del aceite de pitanga sobre las líneas celulares de colon.

4) Analizar el efecto antiproliferativo sobre una línea celular tumoral de colon y una línea celular normal de epitelio colónico.

3.3 OBJETIVOS ACADÉMICOS

1) Profundizar los conocimientos de metodología científica con especial énfasis en planteamiento de hipótesis, diseño experimental y análisis de datos.

2) Adquirir conocimientos del manejo de técnicas básicas en un laboratorio de cultivo de células humanas para llevar a cabo una correcta manipulación experimental.

3) Conocer y organizar materiales para llevar a cabo cada técnica.

4) Planificar las secuencias de etapas a realizar en cada técnica experimental mediante la elaboración de protocolos experimentales.

5) Redactar en forma clara y correcta cada componente de un trabajo de investigación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Antecedentes de usos medicinales de *Eugenia uniflora* (Objetivo específico 1)

Para investigar sobre los usos culturales atribuidos a las hojas de pitanga en Uruguay, principalmente como antiinflamatorio del tracto gastrointestinal, se llevaron a cabo dos procedimientos.

Relevamiento bibliográfico

Se realizó la búsqueda de material bibliográfico en libros y revistas digitales, Timbó, Google Académico, bibliotecas digitales como SciELO y NCBI, entre otras, utilizando como palabras claves: «*Eugenia uniflora*; pitanga; Usos medicinales». La búsqueda se realizó durante los meses de abril, mayo y junio del 2019. Se llevó a cabo el relevamiento de todos los artículos mediante el título y los artículos relacionados con el tema en cuestión, usos medicinales de hojas de Pitanga.

Relevamiento del uso de hojas de pitanga en una muestra de adultos en el departamento de Salto: entrevista de usuarios

A modo de complemento a la información obtenida a partir de la búsqueda bibliográfica, se realizó una entrevista de carácter informal a una muestra de adultos del departamento de Salto, incluyendo personas de ambos sexos, todos mayores de 18 años de edad, previo consentimiento informado para participar de la investigación. Esta muestra incluyó entre otros adultos mayores que utilizan la medicina tradicional dentro del seno familiar y personas con ocupación en diversas áreas incluyendo salud y educación.

Consideraciones éticas

El proyecto con la correspondiente entrevista fue sometido para su evaluación y aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación con Seres Humanos del CENUR Litoral Norte. La formulación de la entrevista, así como su aplicación cumplen con la Declaración Universal de Derechos Humanos, la Declaración de Helsinki, lo dispuesto en la Constitución de la República (Art. 44 y 72), la ley No. 18331 de Protección de datos personales y acción de “Habeas Data” de enero 2019 y el decreto del Poder Ejecutivo 158/019 del 4 de junio de 2019 sobre investigación con Seres Humanos.

Formulario de la entrevista

La entrevista constó de 10 preguntas para indagar sobre el conocimiento de las personas acerca del uso de las hojas de pitanga para los cuidados de su salud, así como también obtener información de cómo el entrevistado accedió a dicho conocimiento. Se registró identificación, sexo, edad, ocupación, nivel educativo y lugar de residencia de los entrevistados, y si tenía conocimiento acerca de la especie *Eugenia uniflora* y usos como especie medicinal, además de algún dato adicional como por ejemplo si padece de algún trastorno digestivo que justificara su uso. La participación en el estudio fue estrictamente voluntaria, pudiendo la persona abandonar el estudio en cualquier momento y cuando lo deseara, pudiendo solicitar el retiro o destrucción de la información sin explicación de la(s) causa(s). La información obtenida fue confidencial y no se usó para ningún otro propósito fuera de los establecidos en esta investigación. Las respuestas al cuestionario y a la entrevista fueron codificadas usando un número de identificación para asegurar el anonimato de las respuestas. Una vez finalizado el proyecto las hojas de las entrevistas se destruyeron. Se le informó a cada participante del potencial riesgo de participar en este proyecto que consistía en la pérdida de confidencialidad ya que se obtuvo información personal. Sin embargo, el equipo de investigadores tomó todas las precauciones necesarias para asegurar de que esto no sucediera. Los beneficios de participar en este proyecto de investigación para los entrevistados fueron los derivados de la adquisición de conocimientos y los participantes no percibieron beneficios económicos por su participación. El formulario de la entrevista se adjunta en el Apéndice 1.

4.2 Producción de extracto de hoja de *Eugenia uniflora* (Objetivo específico 2)

4.2.1 Identificación y localización del material vegetal

Para la producción del aceite esencial de pitanga se seleccionó un ejemplar de la especie *Eugenia uniflora* ubicado en el Jardín de Introducción de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en San Antonio (EFFAS), UdelaR, en Salto, Uruguay (GPS: 31°22'S 57°56'O). Dicha planta fue seleccionada clonalmente como representante de la población de pitangas del Uruguay. Es ampliamente conocida la variabilidad interplantas existente en el

territorio nacional debida a factores climáticos y edafológicos. Estos factores ambientales y de variabilidad interplantas constituyen variables de confusión (o terceras variables) que no pueden ser totalmente controladas o eliminadas en la obtención del extracto y por tanto podrían afectar la validez interna del experimento propuesto. Por tanto, para obtener resultados reproducibles y obviar dicha variabilidad se utilizaron hojas de una sola planta, la cual fue mencionada anteriormente.

Preparación del aceite esencial (AE)

El material vegetal, hojas de *E. uniflora*, fue cosechado durante los meses octubre y noviembre de 2018, y en una segunda instancia en los meses febrero y marzo de 2019, en horas de la mañana, verificando que se encontraran sanas. Se seleccionaron aquellas hojas con tonalidad verde, que mediante la observación directa de las mismas no evidenciaran daños causados por posibles enfermedades, plagas o el ambiente. Dicha selección contó con el asesoramiento de la Ing. Agr. Pamela Lombardo del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía.

Las muestras se dejaron secar durante 4 - 6 días a temperatura ambiente sobre una mesa de madera cubierta con diario, en una habitación que favorecía la libre circulación de aire para luego ser molidas manualmente utilizando una bolsa de nylon (**Figura 7**).



Figura 7. Secado de material vegetal a temperatura ambiente.

El AE se extrajo mediante hidrodestilación usando un sistema de tipo Clevenger (**Figura 8**) (Lombardo, 2015). La técnica consistió en pesar 130-150 g de hojas molidas que luego fueron colocadas en un balón de vidrio con capacidad de 2 L (**Figura 9**). Estas fueron cubiertas con agua destilada y a continuación se procedió a una decocción durante 2 h aproximadamente. El rendimiento de la muestra destilada se expresó en porcentaje de la relación volumen/masa (V/M), calculado de acuerdo con la fórmula

$$R (\%) = (V / M) * 100$$

donde V: volumen de AE (mL), M: masa del material vegetal.

El AE, obtenido de ambas instancias de recolección y destilación, fue recolectado en un único frasco de vidrio oscuro y conservado a 4°C hasta ser utilizado.

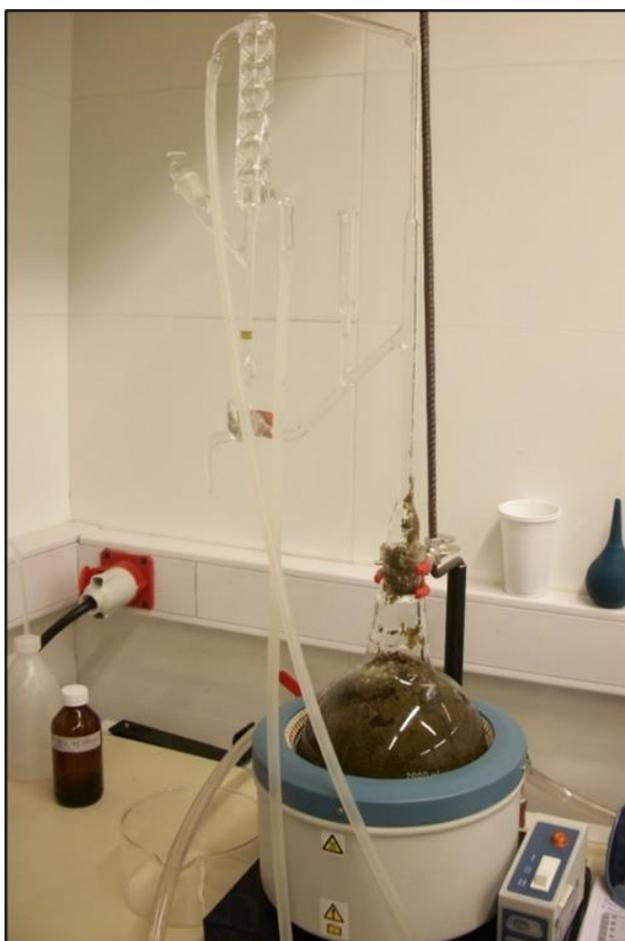


Figura 8. Equipo Clevenger para destilación de aceite esencial de pitanga.



Figura 9. Balón de vidrio con hojas de pitanga molidas para su posterior destilación.

4.2.2 Efecto citotóxico del AE de Pitanga en cultivos de células humanas de colon (Objetivo específico 3)

Para llevar a cabo la determinación de los efectos citotóxicos del aceite esencial de pitanga sobre las líneas celulares de colon se describen a continuación los materiales y procedimientos empleados:

4.2.3 Líneas celulares humanas de colon

El estudio *in vitro* de los efectos del aceite esencial de *Eugenia uniflora* se realizó utilizando dos modelos celulares de colon humano: células tumorales Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™) y las células colónicas normales CCD 841 CoN (ATCC® CRL1790™) (**Figura 10**).

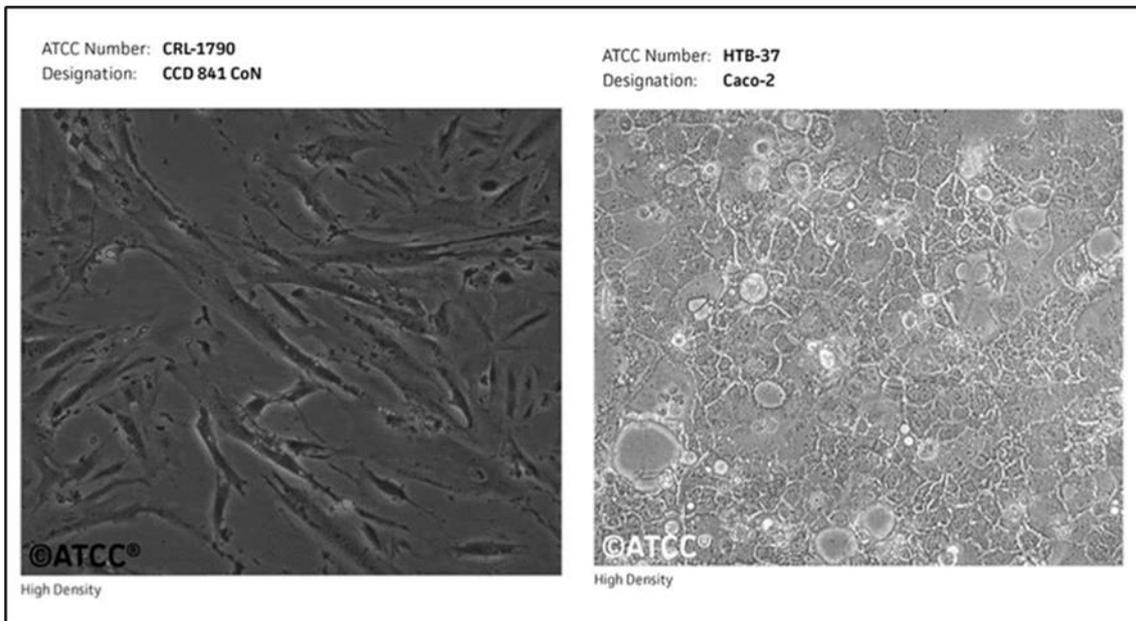


Figura 10. Micrografías de los cultivos celulares de células CCD 841 CoN a alta densidad celular (Derecha) obtenida: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1790.aspx> y de células Caco-2 a alta densidad (Izquierda) obtenida: <https://www.atcc.org/Products/All/htb-37.aspx>.

Línea celular tumoral Caco-2:

La línea celular tumoral humana Caco-2 consiste en células de tipo epitelial aisladas de un adenocarcinoma de colon de un paciente masculino caucásico de 72 años de edad (Fogh et al., 1977). Dicha línea celular fue amablemente cedida por el Laboratorio de Virología del CENUR Litoral Norte, UdelaR. La descripción detallada de la línea celular tumoral Caco-2 (ATCC® HTB-37™) está disponible en <https://www.atcc.org/Products/All/htb-37.aspx>

Línea celular no tumoral CCD 841 CoN:

La línea celular humana de colon normal CCD 841 CoN consiste en células de tipo epitelial, de morfología alargada, aisladas de un feto femenino de 21 semanas de gestación (Thompson et al., 1985). La línea CCD 841 CoN (ATCC® CRL1790™) fue adquirida directamente de ATCC y depositada en el Instituto Pasteur de Montevideo para su conservación. La información detallada de esta línea celular normal de colon se encuentra en <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1790.aspx>

4.2.4 Condiciones de cultivo, subcultivo y mantenimiento de líneas celulares:

La línea celular tumoral Caco-2 fue cultivada en frasco T25 (Cellstar®) en medio de cultivo constituido por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) con alta concentración de glucosa suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (CAPRICORN Scientific). La línea celular normal CCD 841 CoN fue cultivada en frasco T25 en medio α -Minimum Essential Medium (MEM Alpha) (Gibco) con baja concentración de glucosa suplementado con 10 % de SFB; cabe mencionar que de ahora en adelante al mencionar medio de cultivo nos estaremos refiriendo a Medio + SFB. Ambas líneas celulares fueron mantenidas en incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂ y pH estable de 7.4.

El subcultivo de las líneas celulares se realizó una vez que el cultivo alcanza 80 – 90 % de confluencia (por observación con microscopio óptico), dos veces por semana en el caso de la línea celular tumoral y cada 6 - 8 días en la línea celular normal. Para subcultivar se descartó el sobrenadante dejando únicamente las células adheridas al frasco de cultivo, seguido de dos lavados de 3 y 5 mL de buffer fosfato PBS 1X (PBS: Phosphate buffered saline) (Invitrogen) pH 7,4. La solución PBS 1X utilizada contiene: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄. Luego, las células fueron desprendidas de la superficie de cultivo del frasco por tripzinización. Para ello se utilizó 1 mL de una solución de Tripsina- EDTA 0,25 % (2,5 g/L tripsina pancreática porcina, 0,34 g/L EDTA-2Na₂H₂O preparada en 1L de solución salina de Hank sin calcio ni magnesio con pero rojo fenol (D-glucosa 1g/L, KCl 0,4 g/L, KH₂PO₄ 0,06 g/L, NaCl 8 g/L, NaHCO₃ 0,35 g/L, Na₂HPO₄ 0,048 g/L, rojo fenol 0,01 g/L) (CAPRICORN Scientific) a 37 °C, se incubó a esta temperatura durante 3-5

minutos hasta que se observan que las células se desprenden de la pared del frasco y se redondean. Para neutralizar la reacción enzimática de la tripsina se adicionó 2 mL de medio de cultivo. La suspensión celular resultante fue transferida a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado para eliminar el medio con tripsina y el pellet constituido por las células fue resuspendido en 3 mL de medio de cultivo fresco. Para determinar el número de células en el cultivo celular se realizó la dilución de 100 µl de la suspensión celular en 10 µl de una solución de trypan blue (Sigma) al 0,4 % diluido en PBS 1X y realizó el conteo por microscopio óptico de células viables y no viables utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

A continuación, se transfirieron de $3-5 \times 10^4$ células a un nuevo frasco de cultivo y se llevó a un volumen final de 8 mL de la suspensión celular mediante agregado de medio de cultivo. El medio de cultivo fue remplazado por medio fresco cada 48 horas en el caso de la línea celular Caco-2 y cada 96 horas en la línea celular CCD 841 CoN.

4.2.5 Evaluación de efecto citotóxico del AE sobre las líneas celulares

Se exponen las metodologías utilizadas para llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica, citotóxica, del aceite esencial de pitanga sobre las líneas celulares Caco-2 y CCD 841 CoN. Dada las características fisicoquímicas del AE de *E. uniflora* obtenido por hidrodestilación se realizó una dilución inicial de 1/10 del AE stock en un solvente orgánico de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % en PBS. Para la dilución se tomó en cuenta la masa (por pesado en balanza analítica) y la densidad del AE (0,96 g/mL). A partir de este nuevo stock se realizaron las diluciones que se muestran en la **tabla 1** para obtener distintas concentraciones del AE.

Dilución	1/2000	1/1000	1/500	1/200	1/100
Concentración de AE	0,66 mg/mL	1,32 mg/mL	2,64 mg/mL	6,6 mg/mL	13,2 mg/mL

Tabla 1. Diluciones y concentraciones de AE de pitanga testeados.

Ensayo MTT:

Este ensayo fue utilizado para determinar la viabilidad celular. Se basa en la funcionalidad metabólica asociada a oxidorreductasas dependientes de NADP(H), y en la capacidad de las células para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, un compuesto de color violeta (Mosmann, T., 1983). Este compuesto queda retenido en las células, pero puede ser liberado y solubilizado para ser cuantificado; para cuantificarlo este puede ser disuelto en un disolvente orgánico como el DMSO o con isopropanol (Yadav et al. 2014).

Se utilizó el protocolo propuesto por Mosmann adaptado a nuestras condiciones de laboratorio cuya optimización para las líneas celulares estudiadas (número de células, tiempo de desarrollo de cristales y solvente utilizado) fue realizado previamente en el laboratorio. Se emplearon cultivos celulares de Caco-2 y CCD841 CoN que presentaban una viabilidad mayor al 95% por determinación realizada por microscopía óptica con tinción con Trypan Blue (ver más adelante). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, colocando $1,6 \times 10^4$ células/pocillo en el caso de Caco-2 y $3,0 \times 10^4$ células/pocillo en el caso de la línea celular CCD 841 CoN, en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo. Se rotuló sobre cada tapa fecha y hora de siembra, tipo celular, pasaje, número de células sembradas y volumen final. A continuación, la placa conteniendo las células se incubó por 24 h en la estufa de cultivo a 37 °C para permitir la adhesión de las mismas y la formación de monocapas. Posteriormente se adicionó el tratamiento con diferentes concentraciones de AE en un volumen final de 200 μ l y las células tratadas se incubaron en estufa a 37 °C, 5 % CO₂ durante 14 h. Para finalizar el tratamiento, se aspiró la solución que contenía AE, seguido de un lavado con PBS 1X. A continuación, se adicionó 100 μ l de solución MTT stock (5 mg/mL en PBS y glucosa 1,1 M) para permitir el desarrollo de cristales de formazán. Se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂, en oscuridad durante 4 horas. Finalmente, se retiró la solución de MTT y se agregó a cada pocillo 100 μ l de DMSO puro a temperatura ambiente y se agitó durante 5 minutos para disolver los cristales.

Posteriormente se procedió a la lectura de la densidad óptica utilizando un fotómetro o lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 540 nm, y

se estimó el porcentaje de viabilidad y por tanto de sobrevivencia celular, respecto al control negativo, usando la ecuación:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{densidad óptica tratamiento}}{\text{densidad óptica control (-)}} \times 100$$

En este ensayo se utilizaron células en medio de cultivo y sin tratamiento como control negativo; células a las que se le adicionó DMSO al 1 % y DMSO al 10 % como controles solventes, y blancos de medio de cultivo, DMSO y de extracto. Se utilizaron tres replicas tanto de controles como de tratamientos en cada placa.

Ensayo de viabilidad celular en función del tiempo de exposición al AE por tinción con Trypan Blue:

El método del Trypan Blue (TB) es un ensayo que permite evaluar la citotoxicidad. Este ensayo se basa en que las células muertas absorben TB hacia su citoplasma, adquiriendo un color azul, debido a la pérdida de selectividad de su membrana, mientras que las células vivas permanecen sin ser teñidas por el compuesto (Avelar- Freitas, B.A., 2014). Las células teñidas de azul se observan fácilmente mediante microscopía óptica y pueden ser contadas usando una cámara de Neubauer (Keszenman et al., 1992).

Las células se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos mediante la adición de 3 mL/pocillo de una suspensión de 5.0×10^4 células/pocillo en DMEM + 10 % SFB (células Caco-2) o MEM + 10 % SFB (células CCD 841 CoN). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y pH 7.4 durante 24 h antes de iniciar el tratamiento para permitir su correcta adhesión al pocillo. Posteriormente, se colocó en el medio de cultivo el AE de pitanga a una concentración determinada. Se realizaron ensayos independientes para cada concentración de AE testada.

Posteriormente, se procedió al conteo de células con TB a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 h post tratamiento. Para el conteo del número de células viables por mL, inicialmente las células fueron lavadas con PBS y tratadas con Tripsina – EDTA 0,25 % a fin de desprenderlas del pocillo. Para evaluar la viabilidad celular, de cada suspensión celular se tomó 100 µl y se mezcló con 10 µl de TB 0,4 % en un tubo ependorff y luego de 2 min se tomó 10 µl de esta nueva suspensión para realizar el recuento en una cámara de Neubauer, usando el objetivo 10 X del microscopio. Aquellas células birrefringentes y que no

estaban teñidas se contabilizaron como células vivas, mientras que las células teñidas de azul fueron contabilizadas como células muertas.

Se calculó el porcentaje de sobrevivencia celular de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número de células total}} \times 100$$

Los resultados obtenidos de este ensayo se reportaron como porcentaje de viabilidad promedio y se construyeron gráficas de viabilidad celular en función de las diferentes concentraciones de AE estudiadas.

4.3 Evaluación del efecto antiproliferativo del AE sobre las líneas celulares (Objetivo específico 4)

Para analizar el efecto antiproliferativo del AE sobre las líneas celulares estudiadas se desarrollaron ensayos de proliferación celular (Keszenman et al., 1992; Yadav et al. 2014) y se determinó la viabilidad celular en función del tiempo en las muestras de células expuestas de manera crónica al AE.

4.3.1 Estudio de la cinética de proliferación de las líneas celulares CCD 841 CoN y Caco-2, con y sin AE

Para estudiar la cinética de proliferación de células Caco-2, control (sin AE), se sembraron 20 placas de Petri de 60 mm (para una curva de 10 determinaciones con 2 réplicas por cada determinación) con $6,4 \times 10^4$ células/placa en un volumen final de 3 mL de DMEM + SFB. Se rotuló sobre cada tapa la fecha y hora de siembra, tipo de células, pasaje, número de células sembradas y volumen final, y se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂. El medio de cultivo en cada placa fue reemplazado cada 48 h por medio fresco, procedimiento realizado con cuidado de no perturbar los cultivos para evitar desprendimientos de las células por la manipulación.

Cada 24 a 48 h, dependiendo del desarrollo del cultivo, se procedió al conteo de las células en dos placas para obtener el número de células a ese intervalo. Se realizó el seguimiento de la proliferación por observación del aumento de número de células en función del tiempo en el microscopio óptico. Para contar las células en cada placa se descartó el sobrenadante, seguido de dos lavados con 3 mL de PBS 1X. Posteriormente se adicionó 1 mL de tripsina 0,25 % para levantar las células y se agregó 2 mL de medio de cultivo para la

inactivación de la tripsina. Se realizó el conteo tomando 100 µl de la suspensión celular y se adicionó a 10 µl de TB 0,4 % en un tubo ependorff. Luego de 2 minutos se realizó el recuento de células viables y no viables en una cámara de Neubauer. Esta tinción permitió evaluar la viabilidad en función del tiempo de exposición de las células tratadas en forma crónica al AE.

Para estudiar la cinética de proliferación de células Caco-2 expuestas al AE de pitanga se realizó el mismo procedimiento antes mencionado para la curva control, pero se adicionó a las placas 0,66 mg/mL de AE. La selección de esta concentración de AE se basó en los resultados obtenidos del ensayo MTT, siendo la concentración que da la menor letalidad. Las células fueron expuestas al AE durante todo el ensayo de proliferación por lo tanto la cantidad correspondiente de AE fue agregado cada vez que se realizó el cambio de medio a las placas.

Para el estudio de la cinética de proliferación, control y con AE, de las células CCD 841 CoN se llevó a cabo el mismo protocolo que se usó con las células Caco-2 pero, a diferencia de éstas, se sembraron $2,0 \times 10^5$ células/placa en 12 placas de Petri. El conteo de cada placa y su réplica se realizó cada 96 horas, debido a su lento crecimiento.

Se registró día, hora y número de células en función del tiempo por conteo en una planilla específica para cada tipo celular para finalmente construir las correspondientes curvas de proliferación celular.

El análisis de las cinéticas de proliferación se realizó aplicando el modelo logístico de crecimiento de poblaciones celulares siguiente:

$$N(t) = \frac{Nm_{\max}}{1 + e^{-\ln 2 TGC / (t - t_{1/2})}}$$

Donde **N(t)** corresponde al número de células/mL cuantificados al tiempo t; **N_{máx}** corresponde al número de células/mL observado en la fase estacionaria de crecimiento; **TGC** corresponde al tiempo de duplicación celular que es el tiempo que demora la población en duplicarse; **t_{1/2}** corresponde al tiempo medio que es el tiempo que demora la población en alcanzar la mitad del N_{máx}. Se determinó además como parámetro poblacional el tiempo de fase lag o de retardo (**tlag**) que corresponde al tiempo en que la población comienza a duplicarse (Keszenman et al., 1992).

4.4 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos obtenidos mediante la entrevista y su posterior análisis los mismos fueron ingresados en una base de datos utilizando Microsoft Excel y finalmente fueron procesados en tablas y gráficos para su presentación final.

Todos los resultados presentados corresponden a los promedios de por los menos 3 experimentos independientes. Los datos experimentales fueron inicialmente procesados en el programa de computadora Microsoft Office Excel. A partir de los datos promedios se calculó el error estándar de la media y estos se presentan en las figuras. Los gráficos fueron obtenidos utilizando el programa estadístico SigmaPlot v.10.0. Los cálculos de significancia utilizando el test de t se hicieron usando el software estadístico de libre acceso online Medcalc®, y en todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Revisión bibliográfica y entrevista

Se realizó la búsqueda de material bibliográfico para determinar cuáles eran las formas de usos y los beneficios medicinales que se le atribuían a las hojas de *Eugenia uniflora* en el territorio uruguayo y en los países limítrofes como Brasil y Argentina. De hecho, es conocido a lo largo de la historia que Argentina, Brasil en la zona de Río Grande del Sur, Paraguay y Uruguay comparten una amplia variedad de tradiciones y costumbres (Mazzei, 2017). Entre estas se encuentran los usos dados a la flora nativa principalmente por parte de los pobladores indígenas, y que aún hoy en día continúan siendo empleados ya que las culturas conservan vivo el conocimiento y las prácticas medicinales relacionadas con dichas plantas y su aplicación. *Eugenia uniflora* es una de las especies más populares de flora nativa en la región y ha sido utilizada por la medicina tradicional en los diferentes países de la región. De hecho, en la bibliografía se menciona que los indios guaraníes, tribu a la cual los historiadores dicen les debemos parte de los conocimientos sobre productos vegetales de uso farmacológico (Arrillaga de Maffei, 1969), utilizaban la decocción de los frutos de pitanga para tratar episodios de diarrea, digestiones difíciles y como estimulante (Sequeira, 2014). También, se ha propuesto que nuestros aborígenes pueden haber usado *Eugenia uniflora* masticando sus hojas como digestivo (Arrillaga de Maffei, 1969).

En Brasil se atribuye a las hojas de pitanga otras propiedades farmacológicas entre ellas el efecto hipotensor, para el tratamiento de la hiperuricemia, de trastornos gástricos y como hipoglicemiante (Auricchio & Bacchi, 2003). Además, entre los usos de la hoja de *Eugenia uniflora* se describen como eficientes para tratar variadas enfermedades gracias a su acción antipirética, antirreumática y antidiarreica. Es interesante que la infusión preparada con hojas ha sido utilizada como antihipertensiva, y sus extractos para tratar síntomas como la tos y patologías tan variadas como bronquitis e incluso parasitosis (Queiroz et al., 2015). En poblaciones de Argentina, hemos encontrado evidencia bibliográfica del uso de las hojas de *Eugenia uniflora*, en forma de infusión o tereré, para el tratamiento de afecciones del sistema circulatorio como la hipertensión arterial (Amat & Vajia, 1991). Finalmente, en nuestro país se usa la infusión de hojas de pitanga como tónico estomacal,

diurético y antidiarreico, también se les atribuye propiedades como digestivo y propiedad carminativa. La decocción de las hojas es utilizada para tratar anginas en forma de gárgaras y otras afecciones inflamatorias como amigdalitis y faringitis (Sequeira, 2014). Por otra parte, la infusión de las hojas es empleada como analgésica, depurativa, emenagoga y para tratar “dolores reumáticos” (Rodríguez et. al, 2018). En un estudio realizado por Gregorio Tabakián, antropólogo uruguayo, *Eugenia uniflora* es mencionada por individuos declarados descendientes de indígenas como una especie nativa utilizada por sus antepasados. Hacen referencia al uso de las hojas en forma de infusión o masticación para tratar afecciones del sistema genitourinario y el sistema digestivo (Tabakián, 2019).

Resultado de la entrevista sobre: Usos tradicionales de hojas de *Eugenia uniflora*.

Durante la instancia de entrevista se consultó a 58 personas del departamento de Salto (**Figura 11**) acerca del nivel de conocimiento de *Eugenia uniflora* y las diferentes aplicaciones de ésta en el ámbito medicinal. Para responder a nuestro cuestionario el tiempo invertido por los entrevistados fue en promedio de 10 minutos.

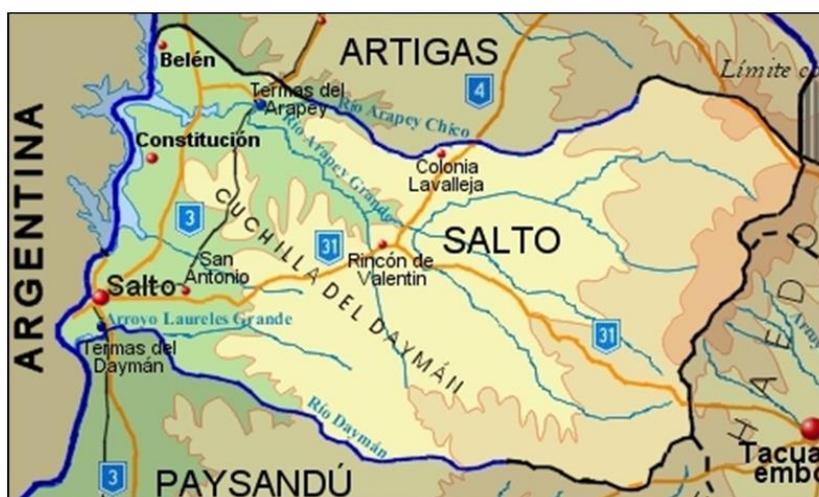


Figura 11. Departamento de Salto. https://en.wikipedia.org/wiki/Salto_Department

De las entrevistas, 41 fueron hechas a personas del sexo femenino y 17 a personas del sexo masculino, todas personas adultas cuyas edades oscilan entre 18 y 83 años y que accedieron voluntariamente y en forma desinteresada a participar en nuestra investigación.

Desde el punto de vista geográfico, todos los entrevistados residen en el departamento de Salto, el 93 % de ellos en la ciudad de Salto, y el 7 % de entrevistados restantes viven en las localidades de San Antonio y Rincón de Valentín (**Figura 11**).

Desde el punto de vista del nivel educativo, observamos que el 14 % de quienes respondieron a nuestro cuestionario contaba con nivel educativo básico (primaria), el 53 % tenía educación secundaria y finalmente el 33 % restante de los entrevistados realizó estudios superiores.

Las entrevistas fueron clasificadas, atendiendo a cuatro grupos etarios, personas de 18-34 años; 35-50 años, 51-70 años y personas de 71 años en adelante. Las características demográficas de la muestra entrevistada se presentan en la **tabla 2**.

Características	No.	%
Sexo		
Femenino	41	71
Masculino	17	29
Edad (años)		
18 a 34	16	28
35 a 50	20	34
51 a 70	13	22
≥ 71	9	16
Nivel educativo		
Primaria	8	14
Secundaria	31	53
Superior	19	33
Localidad		
Salto	54	93
San Antonio	3	5
Rincón de Valentín	1	2

Tabla 2. Características demográficas de los 58 entrevistados sobre el uso de pitanga del departamento de Salto.

Mediante la primera pregunta de nuestro cuestionario consultamos a los usuarios a cerca de su conocimiento del árbol de pitanga y como resultado se obtuvo que el 93 % de los entrevistados tenía conocimiento e identificaba dicho árbol; el 7 % restante no lo conocía, tenía dudas o lo confundía con otro árbol.

De aquellos entrevistados que afirmaron tener conocimiento del árbol de pitanga, únicamente el 9 %, es decir, 5 personas sabían su nombre científico, *Eugenia uniflora*, o habían oído mencionarlo.

A través de la pregunta número tres del cuestionario se hizo un relevamiento acerca de los usos medicinales que se les dan culturalmente a las hojas de *E. uniflora* conocidos y empleados por los participantes de la entrevista, a lo que un total de 13 (24 %) de los entrevistados respondieron tener conocimiento de uno o más usos que se les pueden dan a las hojas de pitanga para tratar dolencias en la intimidad del hogar, como un tratamiento momentáneo y de fácil acceso. El resto de los entrevistados indicaba tener conocimiento únicamente del consumo de sus frutos o algún otro uso no medicinal. En la **tabla 3** que se presenta a continuación se detallan datos correspondientes a los usuarios que cuentan con conocimiento acerca de usos medicinales atribuidos a las hojas de *E. uniflora*.

	Sexo	Edad	Nivel educativo	Ocupación	Aplicación	Consumo Sí/No
1	Femenino	61	Secundario	Jubilada	Sistema digestivo Presión arterial	Si
2	Femenino	37	Superior	Maestra	Sistema digestivo	Si
3	Masculino	66	Secundario	Jubilado	Sistema respiratorio	Si
4	Masculino	46	Secundario	Vivero	Sistema digestivo – Sistema respiratorio	Si
5	Femenino	26	Secundario	Vendedora mueblería	Sistema respiratorio	No
6	Femenino	83	Primario	-	Dolores reumáticos	Si
7	Masculino	31	Secundario	Comerciante	Sistema digestivo	No
8	Femenino	41	Secundario	Doméstica	Sistema respiratorio	No
9	Femenino	60	Superior	Téc. Podóloga	Sistema digestivo Orexígeno	No
10	Masculino	43	Primario	Peón chacra	Diurético	No
11	Femenino	81	Primario	-	Presión arterial Sistema digestivo	Si
12	Femenino	34	Primario	Desempleada	Sistema digestivo Anemia	Si
13	Femenino	42	Superior	Odontóloga	Presión arterial Diurético	No

Tabla 3. Porcentaje de entrevistados que conocen usos atribuidos a las hojas de pitanga con fines medicinales.

Dentro de los usos mencionados por los entrevistados notamos que la gran mayoría eran empleados para el tratamiento de trastornos relacionados al sistema digestivo, incluyéndose dentro de éstos diarreas, indigestión, dolores estomacales o acidez. En segundo lugar, destacaron los usos vinculados al sistema respiratorio como tos y aumento de secreciones, lo que comúnmente las personas llaman “ataque de pecho” e infección en la garganta. Algunos otros usos mencionados, pero en menor proporción fueron para tratar la hipertensión, dolores reumáticos, como diurético, anemia y como orexígeno (**Figura 12**).

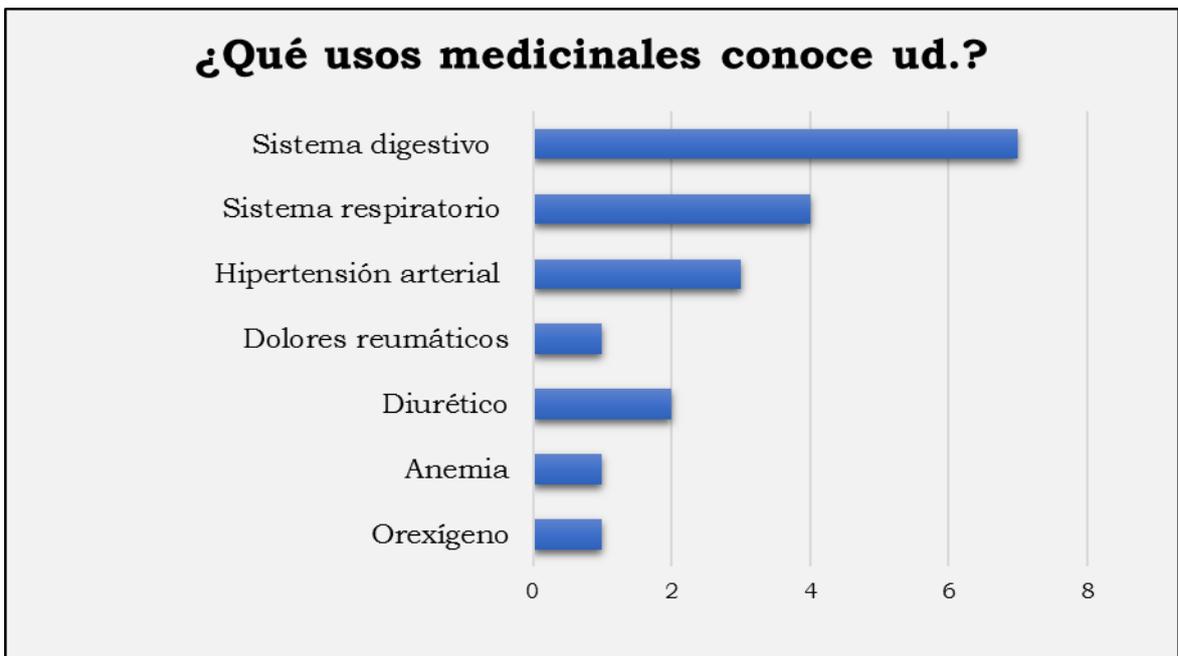


Figura 12. Principales trastornos y sistemas del organismo tratados utilizando hojas de *Eugenia uniflora*.

Al ser consultados acerca de si el entrevistado o algún familiar cercano había consumido té de pitanga o algún preparado hecho con hojas de pitanga para tratar alguna de estos trastornos, el 54 % (7 usuarios) respondió que afirmativamente. Aquellos que indicaron no haber consumido algún preparado a base de hojas de pitanga argumentaron que, si bien conocían las aplicaciones, no sintieron la necesidad de hacerlo, optan por otros métodos o no se sentían totalmente seguros respecto a su efectividad o posibles efectos adversos.

Se continuó con el cuestionario preguntando acerca de cuál era la forma de prepararlo. Como resultado se observó que la mayoría de quienes lo consumen o consumieron en algún momento lo hicieron a modo de infusión, colocando hojas de pitanga generalmente secas en una taza, agregando agua previamente hervida y dejando reposar hasta que la mezcla tome una temperatura adecuada para su consumo. Otras alternativas relatadas fueron la utilización de las hojas de pitanga en el mate, ya sea dentro del mate o dentro del termo con agua caliente. En una única oportunidad fue mencionada la preparación como una decocción. En el relato de esta preparación, el entrevistado coloca las hojas de pitanga solas o con trozos de corteza en un recipiente que se lleva a fuego hasta su ebullición siendo finalmente la mezcla colada para ser utilizada (**Figura 13**).



Figura 13. Formas de preparar las hojas de pitanga para su posterior uso medicinal.

Al consultar sobre la cantidad y frecuencia de consumo del preparado de hojas, todos los usuarios del mismo coincidieron en que el consumo se da en ocasiones puntuales, por ejemplo, cuando se presenta un dolor estomacal, episodios de diarrea o tos y en pequeños volúmenes, generalmente una tacita de té (100-150 mL). Esta forma de consumo fue atribuida a que su uso en exceso podría presentar resultados no deseados. A modo de ejemplo, un usuario afirmó tomar té de hojas de pitanga para tratar la tos pero que un consumo exagerado le resultaba en una caída de la presión arterial.

En cuanto al modo de uso del preparado, el 86 % de quienes lo consumieron lo hicieron en forma de bebida y un único entrevistado relató el uso de la decocción para realizar gárgaras.

Pudimos establecer también que la mayoría de quienes tenían conocimiento de alguna aplicación medicinal de las hojas de pitanga obtuvieron ese conocimiento de familiares adultos (padre, madre o abuelos) (46 %); un 31 % de estas personas lo obtuvo de otros allegados como vecinos o amigos, adultos y adultos mayores; el 15 %, es decir, dos de ellos lo adquirieron a través de la búsqueda en internet, mientras que una sola persona mencionó que el uso de *E. uniflora* le fue recomendado en un comercio local dedicado a la venta de productos naturales con fines medicinales, enseñándonos un folleto donde se aprecian las diferentes propiedades de ésta especie (**figura 14**).

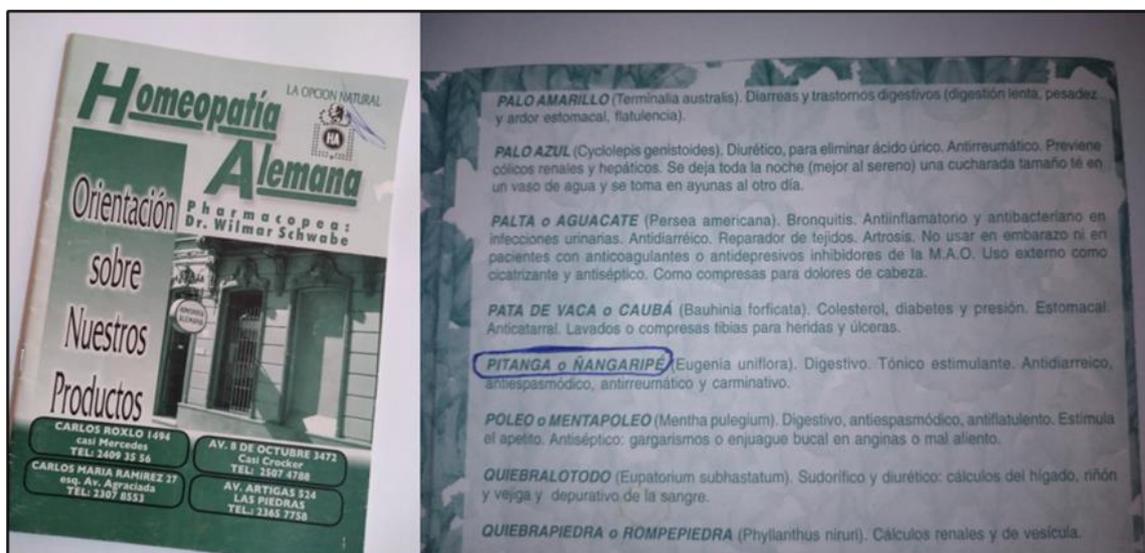


Figura 14. Folleto de proporcionado a usuario de *E. uniflora* por comercio dedicado a la venta de productos de uso homeopático.

Finalmente, a modo de complemento, se consultó a los entrevistados sobre si padecía de algún tipo de trastorno digestivo que lo haya motivado a usar hojas de pitanga para su tratamiento. Aquí no se obtuvieron muchas respuestas; de aquellos quienes, si respondieron a esta pregunta, solo 2 personas mencionaron sufrir de acidez estomacal y una mencionó padecer estreñimiento. Sin embargo, ninguno de ellos utilizó preparados con hojas de pitanga como parte del tratamiento. Por otro lado, una de las personas que efectivamente consumieron té de pitanga lo hizo para aliviar la diarrea, pero aclaró que no es un trastorno digestivo crónico o que padezca con frecuencia.

5.2 Producción del extracto de hojas de *Eugenia uniflora*

La planta seleccionada para la obtención del aceite esencial de pitanga fue el ejemplar VIII-7 de *Eugenia uniflora* (**Figura 15**), ubicada en el Jardín de Introducción de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía, UdelaR, en Salto, Uruguay (GPS: 31°22'S 57°56'O). La misma representa una gran proporción de las plantas de *Eugenia uniflora* que se hallan distribuidas en todo el territorio uruguayo y fue previamente elegida para su caracterización y registro teniendo en cuenta su sabor, producción y el tamaño de sus frutos (**Figura 16**). Su identificación fue llevada a cabo por la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía, CENUR Litoral Norte, sede Salto, UdelaR y una muestra clonal de la misma fue registrada con el número de catálogo *E. uniflora* MVJB 29158 en el “Museo Jardín Botánico Prof. Atilio Lombardo”, Montevideo.



Figura 15. Ejemplar VIII-7 de *Eugenia uniflora* planta seleccionada para el presente estudio.



Figura 16. Ejemplar VIII-7 en etapa de floración (A) y en etapa de fructificación (B).

Luego de la recolección, secado y molienda del material vegetal (**Figura 17**) se procedió a cuantificar el total del mismo por pesado, constatándose que el total de material recolectado para la primera instancia de extracción fue de 5600 g. Se llevó a cabo el proceso de hidrodestilación para obtener el AE de pitanga como se describió en Material y Métodos. Cada instancia de destilación duró entre 1.5 - 2 h aproximadamente y como resultado de los sucesivos procesos de extracción se recolectó 57,7 g de AE (rendimiento de 1,0%). En la segunda instancia de extracción el total de material recolectado fue de 2150 g y la cantidad de AE recolectado fue 20 g (rendimiento de 0,9%). En total se logró obtener 77,4 g de AE de pitanga que fueron conservados en un frasco de vidrio,

oscuro, a 4°C para su posterior uso (**Figura 18**). Dicho aceite resultó muy característico ya que no permanecía unido, sino que se separaba en fracciones y tampoco permanecía flotando sobre el agua en el equipo recolector.



Figura 17. Material vegetal seco y molido para extracción de aceite esencial.



Figura 18. Frasco oscuro para conservación del AE de pitanga.

5.3 Determinación del efecto citotóxico del AE sobre las líneas celulares

La determinación del efecto citotóxico del AE de *E. uniflora* se realizó utilizando el ensayo de MTT en las líneas celulares de colon tumoral Caco-2 y normal CCD841 CoN. En la **Figura 19** se muestran las imágenes microscópicas con magnificación 10X de cultivos en condiciones óptimas de Caco-2 (A) y CCD841 CoN (B). Las células Caco-2 presentaron apariencia poligonal adheridas al soporte de cultivo, organizadas formando una monocapa,

estableciéndose uniones estrechas entre las mismas, a los seis días posteriores a su siembra (144 h). En la observación microscópica de la línea celular CCD841 CoN se apreciaron células de morfología alargada que crecen en forma desorganizada, a los siete días desde su siembra (168 h). En ambos cultivos se observaron además algunas células redondeadas y de aspecto birrefringente suspendidas en el medio de cultivo, las cuales han perdido su capacidad de adherencia (círculos rojos en la Figura 19). La respuesta a las diferentes concentraciones del AE y un periodo de exposición de 14 h se estimó calculando el porcentaje de sobrevida celular.

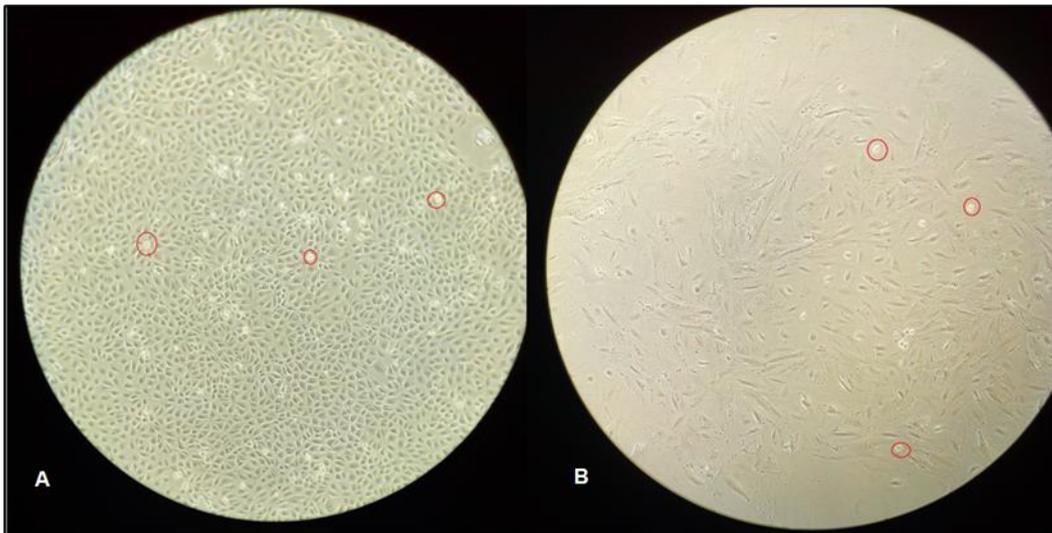


Figura 19. Microfotografías de cultivos de células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 (A) y células normales de colon humano CCD 841 CoN (B) con magnificación 10X. Los círculos rojos corresponden a células redondeadas y de aspecto birrefringente no adheridas al soporte de cultivo.

Teniendo en cuenta como hipótesis de trabajo que el AE de pitanga produciría un efecto letal en función de la concentración de AE, se obtuvieron las curvas de dosis-respuesta de sobrevida celular en función de la concentración de AE en ambas líneas celulares.

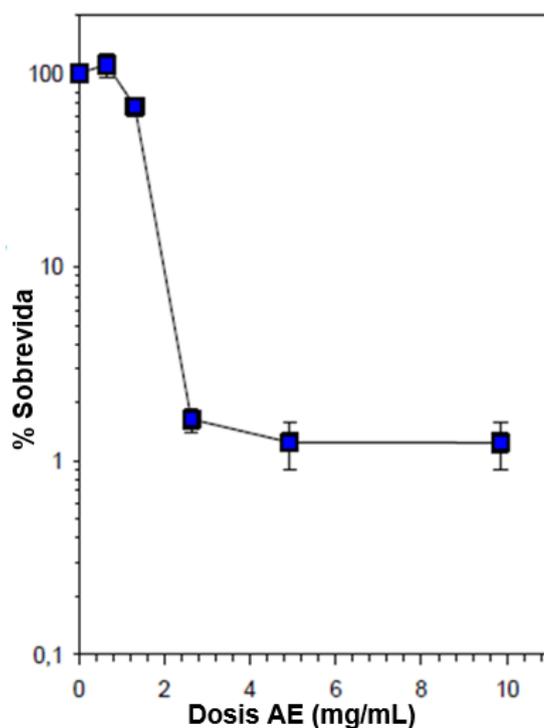


Figura 20. Curva de dosis respuesta de sobrevivencia de células normales CCD 841 CoN expuestas durante 14 h a diferentes concentraciones de extracto de hojas de pitanga.

La curva de dosis respuesta correspondiente a la línea celular normal de colon CCD 841 CoN expuesta a diferentes concentraciones de AE durante 14 h se presenta en la **Figura 20**. Se puede observar que la menor concentración de AE testada [AE] = 0,66 mg/mL no modificó el porcentaje de células viables en relación al control siendo la sobrevivencia de un 100%. A partir de esa concentración de AE se verificó un aumento exponencial de la letalidad celular alcanzando el 1% de sobrevivencia ante la exposición a 2,64 mg/mL. De hecho, se observó que la sobrevivencia celular decreció 40 veces cuando se duplica la concentración de AE de 1,32 mg/mL a 2,64 mg/mL. A concentraciones [AE] \geq 2,64 mg/mL, la sobrevivencia celular se mantuvo a un nivel aproximado al 1% en las demás dosis testadas.

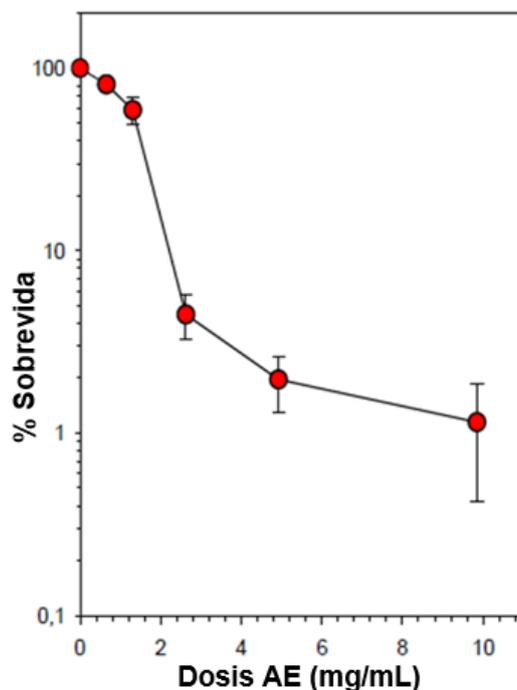


Figura 21. Curva de dosis respuesta de sobrevivencia de células tumorales de colon Caco-2 expuestas durante 14 h a diferentes concentraciones de extracto de hojas de pitanga.

En la curva de dosis respuesta correspondiente a las células tumorales de colon Caco-2 (**Figura 21**) se observa un decrecimiento exponencial con dos componentes de la sobrevivencia celular con concentraciones crecientes de AE de pitanga. El primer componente exponencial de mayor pendiente se observó hasta alcanzar $[AE] = 2,64$ mg/mL donde la sobrevivencia celular fue de 4,5%. A partir de esta concentración la pendiente de la curva de dosis respuesta fue menor solo alcanzando el 1% de sobrevivencia celular a la mayor dosis testada de $[AE] = 13,2$ mg/mL.

Para confirmar la letalidad observada por bajas concentraciones de AE en la línea celular tumoral Caco-2 se estudió la viabilidad celular utilizando el ensayo de tinción con TB con la finalidad de complementar los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT. Este último por su diseño evalúa la letalidad celular inducida por 14 h de exposición al AE, sin embargo, no aporta información sobre si las células sobrevivientes puedan presentar letalidad diferida luego del tratamiento en un intervalo temporal que exceda su ciclo celular. Por tanto, se determinó la viabilidad celular en función del tiempo de exposición a $[AE] = 0,66$ mg/mL que fue la concentración más baja de AE testada. En breve, las células sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos fueron tratadas con $[AE] = 0,66$

mg/mL durante 32 h determinándose a intervalos regulares el número de células por mL en el cultivo y la correspondiente viabilidad celular.

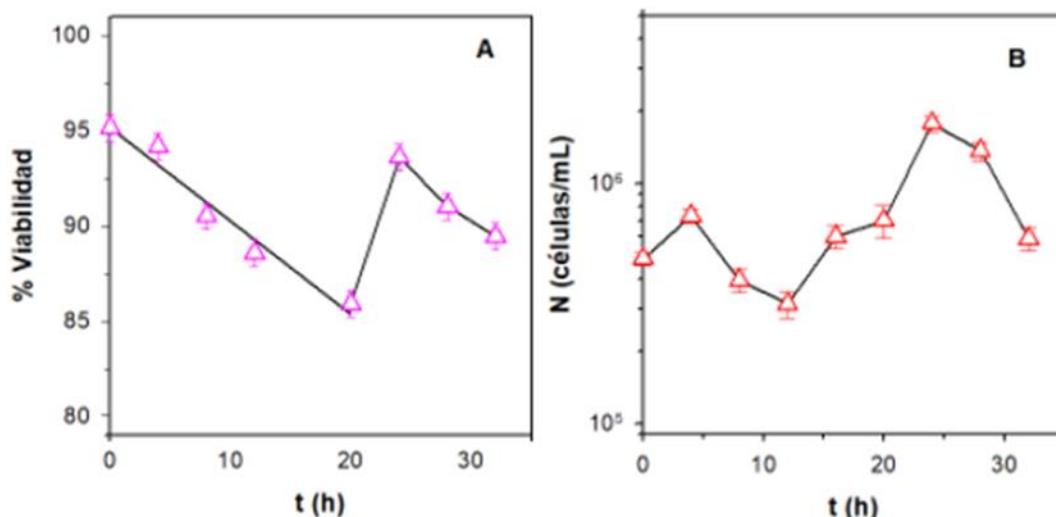


Figura 22. Curso temporal de la viabilidad celular en línea tumoral Caco-2 tratada con una dilución 1/2000 de AE de pitanga ([AE] = 0,66 mg/mL). (A) Porcentaje de viabilidad celular en función del tiempo; (B) Número de células por mL en función del tiempo y correspondientes con la viabilidad que se muestra en (A).

La **Figura 22** panel A muestra que el porcentaje de viabilidad de las células Caco-2 tratadas con AE disminuye en función del tiempo alcanzando un mínimo a las 20 h, seguido de un aumento de la sobrevivencia a las 24 h, decreciendo nuevamente el porcentaje de células viables a partir de este tiempo hasta el final del ensayo. El conteo de número de células totales por mL (**Figura 22 B**) realizado concomitantemente con el cálculo del porcentaje de viabilidad del cultivo mostró que la concentración celular en el cultivo presentó un mínimo a las 14 h seguido de un aumento transitorio de la concentración celular hasta las 24 h en que se verificó una duplicación del número de células. A partir de ese máximo de concentración celular se observó un decrecimiento del número de células que fue concomitante con el decrecimiento de la viabilidad celular (comparar **Figura 22 A** y **B**). Es de hacer notar que el tratamiento con AE de pitanga se realizó en cultivos en crecimiento exponencial (cultivos 80% confluentes) y por tanto la población está constituida por células en todas las fases del ciclo celular. Además, el tiempo de duplicación de las células Caco-2 es de 24 h en nuestras condiciones experimentales y cuya cinética de crecimiento poblacional se presenta en la sección siguiente.

5.4 Estudio de la cinética de proliferación de ambas líneas celulares

Para estudiar el potencial efecto antiproliferativo del AE de *E. uniflora* se determinó la cinética de crecimiento de cultivos de células de colon tumorales Caco-2 y normales CCD841 CoN controles y expuestas al AE. Las cinéticas de proliferación sin tratamiento y en condiciones óptimas de cultivo se presentan en las **Figuras 23** A y B correspondientes a CCD841 CoN y Caco-2 respectivamente.

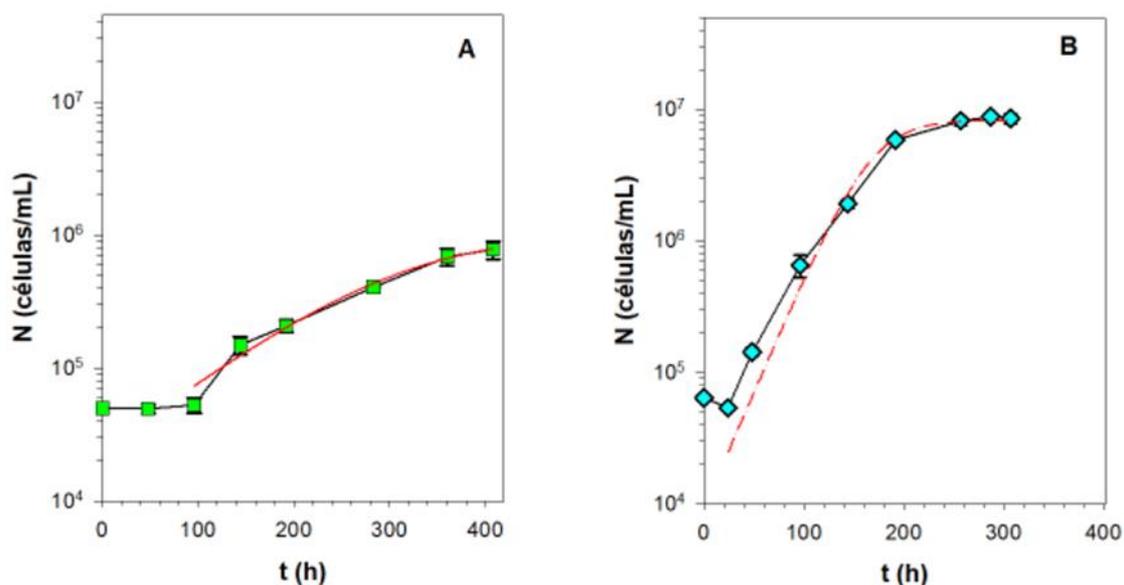


Figura 23. Cinéticas de proliferación de las líneas celulares de colon normal CCD841 CoN (A) y tumoral Caco-2 (B) en condiciones óptimas de crecimiento. Los trazados rojos en las gráficas corresponden a los ajustes de las curvas de acuerdo al modelo logístico de crecimiento de poblaciones utilizado para el cálculo de los parámetros de las curvas de proliferación.

Como era de esperarse, la línea celular tumoral Caco-2 presentó una cinética de proliferación caracterizada por un mayor número de células alcanzado en la fase estacionaria y una mayor pendiente de la fase exponencial de crecimiento indicando una cinética de proliferación más rápida que en la línea celular normal CCD841 (comparar las **Figuras 23** A y B). Estas diferencias observadas en las cinéticas de proliferación en condiciones óptimas de las líneas Caco-2 y CCD841 concuerdan con las características tumoral y no tumoral respectivamente.

A partir de las curvas de proliferación obtenidas se calcularon los parámetros cinéticos para las dos líneas celulares (**Tabla 4**). Partiendo de los mismos se pudo establecer que la línea celular tumoral Caco-2 alcanzó un

número máximo de células durante la confluencia o fase estacionaria 8,2 veces mayor que la línea celular normal CCD 841 CoN. En relación al tiempo de duplicación celular o TGC se observó que en la línea normal fue 3,4 veces mayor que el de la línea célula celular tumoral. El $t_{1/2}$ necesario para que las células CCD 841 logren alcanzar la mitad de su $N_{m\acute{a}x}$ fue de aproximadamente 309,5 h, es decir, casi el doble (1,9 veces) que el tiempo necesario para que las células Caco-2 lleguen a la mitad de su $N_{m\acute{a}x}$, 168,0 h. En cuanto al t_{lag} , tiempo para reanudar la proliferación luego de iniciado el cultivo, se observó que este fue 5,5 veces mayor en la línea celular normal que en la línea celular tumoral.

Tipo celular	$N_{m\acute{a}x}$ (células/mL)	TGC (h)	$t_{1/2}$ (h)	t_{lag} (h)
Control CCD841 CoN	$1,0 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$	$57,9 \pm 8,9$	$309,5 \pm 30,8$	$66,0 \pm 3,0$
Control Caco-2	$8,2 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$	$17,1 \pm 3,0$	$168,0 \pm 5,1$	$12,0 \pm 0,60$

Tabla 4. Parámetros cinéticos de proliferación de las líneas celulares de colon normal CCD841 CoN y tumoral Caco-2 sin AE de pitanga y en condiciones óptimas de cultivo.

La viabilidad celular se monitoreó durante todo el estudio de proliferación mediante el método de tinción por exclusión de TB. En condiciones óptimas de cultivo la viabilidad celular se mantiene por encima del 85% durante el periodo de observación en ambas líneas celulares, pero aun así se observó que la viabilidad fue significativamente diferente entre las mismas, resultando tener una mayor viabilidad celular la línea celular tumoral Caco-2 (mayor al 95%) en relación a la línea celular normal CCD841CoN (**Figura 24**).

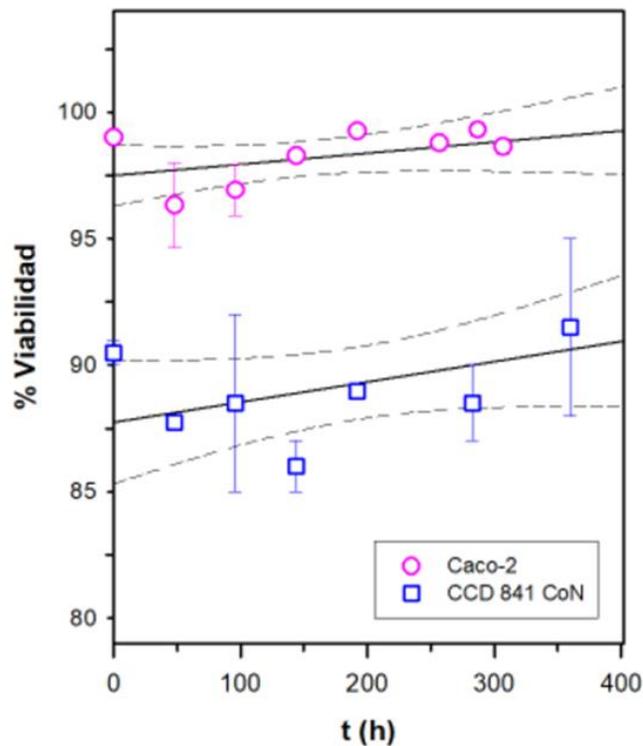


Figura 24. Viabilidad celular de las líneas celulares de colon normal CCD841 CoN (azul) y tumoral Caco-2 (rosado) determinada durante los estudios de proliferación en condiciones óptimas de crecimiento. Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza al 95%.

El estudio de la cinética de proliferación de ambas líneas celulares en presencia de AE de pitanga se realizó con la finalidad de observar las posibles modificaciones de la capacidad proliferativa inducidas por el AE. Dado los resultados de los estudios de sobrevivencia que mostraron efectos letales del AE en ambas líneas celulares, se seleccionó la menor concentración testada de AE que permita la sobrevivencia celular. La línea celular tumoral Caco-2 tratada con 0,66 mg/mL de AE adicionado al medio de cultivo mostró proliferación con aumento del número de células en el cultivo durante 11 días luego de lo cual comenzó a disminuir el tamaño de la población (**Figura 25**).

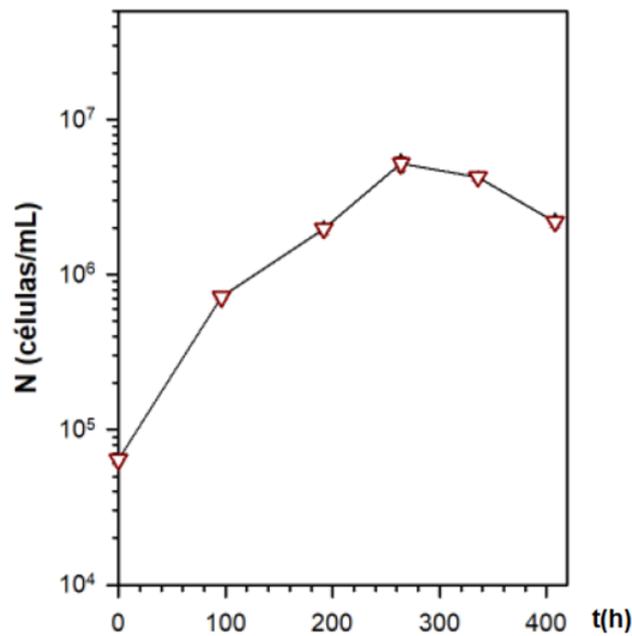


Figura 25. Cinética de proliferación de la línea celular de colon tumoral Caco-2 tratada con 0,66 mg/mL de AE adicionado al medio de cultivo.

No fue posible obtener resultados con la línea celular normal CCD 841 CoN, ya que una vez iniciada la exposición de las células al aceite esencial las células presentaban características de células no viables, observándose una muerte celular importante ya a las 48 h de incubación, no resultando posible realizar conteos posteriores (**Figura 26**).

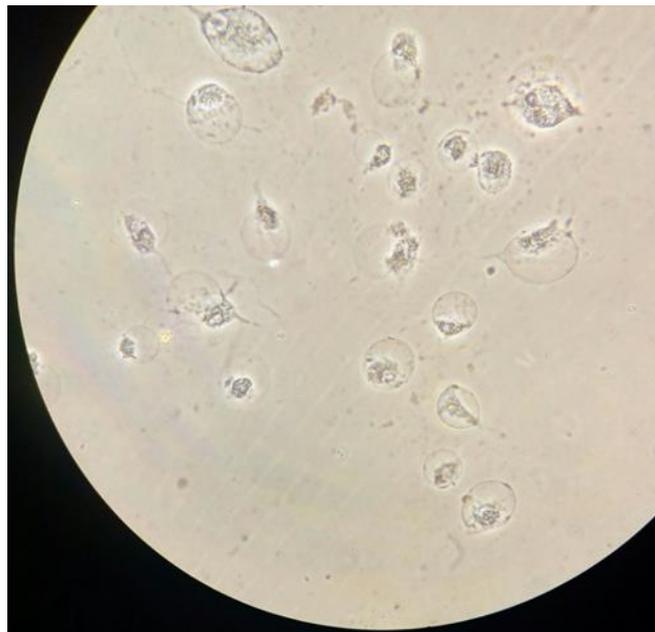


Figura 26. Microfotografía de células CCD841 CoN luego de 48 h de incubación con 0,66 mg/mL de AE de pitanga. Magnificación 100X.

Como resultado del tratamiento con AE se observaron modificaciones de los parámetros cinéticos que caracterizaban a la línea celular Caco-2, de acuerdo a un enlentecimiento del crecimiento poblacional como son un menor número máximo de células ($N_{m\acute{a}x}$) alcanzado antes de comenzar la fase de declinación, un aumento del TGC de 3,5 veces y un aumento en el $t_{1/2}$ pasando de 168,0 h a 225,0 h. Resultó llamativo que, a pesar de verificarse una disminución de la proliferación, el tiempo de retardo o de fase lag en el comienzo de la proliferación (t_{lag}) disminuyó a 0 (**Tabla 4**).

Tipo celular	$N_{m\acute{a}x}$ (células/mL)	TGC (h)	$t_{1/2}$ (h)	t_{lag} (h)
Caco-2 tratada con AE	$5,2 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5$	$60,0 \pm 3,0$	$225,0 \pm 11,3$	0

Tabla 5. Parámetros cinéticos de proliferación de la línea celular tumoral de colon tratada con 0,66 mg/mL de AE de pitanga.

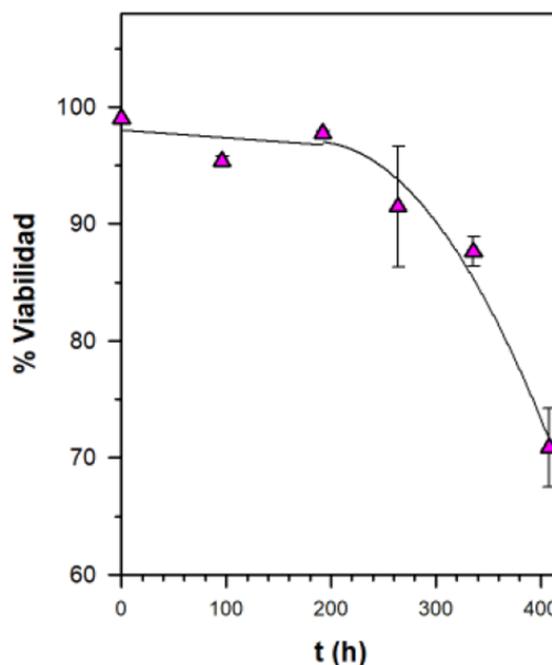


Figura 27. Viabilidad celular de la línea celular tumoral Caco-2 determinada durante los estudios de proliferación con tratamiento de 0,66 mg/mL de AE adicionado al medio de cultivo.

Simultáneamente con la cuantificación de la cinética de proliferación de las células Caco-2 tratadas con AE se evaluó la viabilidad celular en función del tiempo (**Figura 27**). Se observa que la viabilidad celular en la población tratada

no presenta modificaciones hasta las 200 h luego de lo cual comienza a disminuir. Esta disminución de la viabilidad podría ser causa de la fase de declinación de la proliferación observada en la cinética de crecimiento de la **Figura 24**.

6. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo y dentro de los tipos de cáncer más comunes se halla el cáncer colorrectal (CCR) (OMS, 2018). Para Uruguay el CCR representa un importante problema de salud pública lo que hace necesario contar con herramientas que ayuden a prevenirlo, diagnosticarlo en forma temprana y tratarlo (MSP, 2018; Barrios & Garau, 2017).

La especie *Eugenia uniflora*, conocida popularmente como pitanga, ha sido utilizada tradicionalmente en sistemas de curación populares de nuestro país y países vecinos para tratar múltiples trastornos como diarreas, dolores estomacales, dolores reumáticos, hipertensión y en forma más general como antiinflamatorio (Sequeira, 2014; Rodríguez et. al, 2018; Queiroz et al., 2015). También, diversos estudios han reportado que *Eugenia uniflora* posee propiedades como antibacteriano, antiparasitario, antifúngico e incluso actividad como antioxidante (Queiroz et al., 2015; Novack Victoria et al., 2012). La elección de esta especie para llevar a cabo el presente estudio se realizó considerando los mencionados usos tradicionales y bajo la hipótesis de que el aceite esencial preparado a partir de hojas de pitanga podría presentar efectos anticarcinogénicos y antitumorales que permitan su uso como agente quimiopreventivo y/o terapéutico del cáncer colorrectal. Proponemos además que estos efectos antineoplásicos se producirían mediante la inhibición de la proliferación celular en células colónicas normales y tumorales y letalidad de células tumorales.

6.1 Las propiedades beneficiosas para la salud de las hojas de pitanga son de conocimiento popular. Investigación en una muestra de pobladores adultos del Departamento de Salto

El uso de productos naturales, como las plantas y sus derivados han sido utilizados desde la antigüedad para el cuidado de la salud (Días et al., 2012). En Uruguay es conocido que existe un amplio uso tradicional de plantas para la prevención y tratamiento de diferentes patologías mediante la costumbre popular de elaborar preparados con plantas dentro del ámbito doméstico. Para investigar sobre los usos culturales atribuidos a las hojas de *Eugenia uniflora* utilizamos como herramienta metodológica la búsqueda de información por un lado mediante una revisión bibliográfica y por otro mediante la realización de

entrevistas a 58 personas del departamento de Salto, 41 de ellas de sexo femenino y 17 personas de sexo masculino, todos adultos con edad entre 18 y 83 años (Figura 11, Tabla 2 y 3), acerca del nivel de conocimiento de *E. uniflora* y de las diferentes aplicaciones en el ámbito medicinal (Tabla 3, Figura 12).

Los resultados de la entrevista mostraron que el 93 % de los entrevistados en el Departamento de Salto conocen el árbol *E. uniflora*, lo cual está de acuerdo con los datos obtenidos de la literatura donde se considera que es una especie ampliamente conocida por los pobladores de la región (Vignale & Bissio, 2005). Por otra parte, también se puso de manifiesto que la mayoría de las personas identifica a dicho árbol por su nombre común o vulgar, pitanga, y desconocen su nombre científico, *Eugenia uniflora*.

Los usos medicinales que se dan a las hojas de *E. uniflora* en la medicina tradicional mencionados por los entrevistados, como tratamiento para trastornos vinculados al sistema digestivo, sistema respiratorio y sistema circulatorio entre otros (Tabla 3, Figura 12), resultaron similares a los usos medicinales que se les atribuyen a estas hojas en Argentina, Brasil y Uruguay. En la literatura se hace referencia a los usos de pitanga como antidiarreico, tónico estomacal, digestivo, hipotensor, antirreumático, diurético y para tratar la tos (Auricchio & Bacchi, 2003; Queiroz et al., 2015; Sequeira, 2014; Rodríguez et al., 2018; Tabakián, 2019). Sin embargo, a partir de la encuesta realizada surge la mención de usos de los preparados a base de hojas de pitanga para tratar otros trastornos de la salud como la anemia e incluso como estimulante del apetito (orexígeno), los cuales no habían sido reportados en la bibliografía consultada.

El análisis de los datos recogidos durante la entrevista mostró que el 24% de los entrevistados que afirmaron tener conocimiento de algún uso de las hojas de pitanga con un fin medicinal, el 69 % corresponde a mujeres. Es interesante destacar sin embargo que dentro de la muestra de individuos que respondieron a nuestro cuestionario el sexo masculino y el sexo femenino no se encuentran igualmente representados dado que se entrevistaron 41 mujeres (71%) y 17 hombres (29%) (Tabla 2). A pesar que el tamaño muestral fue limitado y el área geográfica de investigación estuvo acotada al Departamento de Salto, este resultado estaría en concordancia con datos hallados en la bibliografía que sugieren que, si bien tanto hombres como mujeres hacen uso y transmiten

saberes referidos a las plantas medicinales, la práctica de terapias basadas en el uso de plantas medicinales está asociada históricamente al género femenino, especialmente a las de mayor edad. Dicho rol continúa siendo hoy en día de gran relevancia en nuestra sociedad (Tabakián, 2016). Además, en América Latina y más precisamente en el sector urbano, los tratamientos con plantas medicinales se manifiestan con mayor frecuencia en las mujeres ya que son quienes preparan los “remedios” caseros (Lima et al., 2018).

Adicionalmente, se observó que la mayoría de los usuarios que reportaron usos medicinales para las hojas de *E. uniflora* se concentran en los grupos etarios mayores a 35 años y el 77 % de los mismos manifestó haber obtenido este conocimiento de personas adultas, ya sea familiares u otros allegados. Por tanto, estos resultados indican, en acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Tabakián, 2016; Correa, 2002), que dentro de la medicina tradicional los conocimientos acerca de medicamentos de tipo herbario residen frecuentemente en las personas de más edad, más ancianos. Además, estos conocimientos van siendo transmitidos de forma oral y mediante experiencias que se observan dentro del hogar a las nuevas generaciones, contribuyendo de esta manera a la conservación de dichos conocimientos. Sin embargo, es importante mencionar el hecho de que, como complemento al método de transmisión tradicional, actualmente existen nuevas formas de llevar a cabo este proceso de transmisión de saberes por el surgimiento de nuevos espacios de interacción social, la accesibilidad a los medios de comunicación, el internet y una cantidad importante de bibliografía que se halla a disposición y relativamente accesible a todos (Tabakián, 2016). Esta forma actual de transmisión de saberes fue evidenciada en las respuestas a nuestro cuestionario donde algunos entrevistados mencionan haber adquirido estos conocimientos de internet e incluso de un comercio local dedicado a la venta de plantas medicinales entre otras cosas.

Es interesante que algunos entrevistados mencionaron no haber consumido preparados medicinales a base de hojas de pitanga, a pesar de conocer sus posibles aplicaciones y potencial beneficio, por no sentirse totalmente seguros de su efectividad o posibles efectos adversos. Es conocido que pocas plantas están validadas científicamente e incluso algunas pueden presentar efectos tóxicos en situaciones de uso inapropiado. Por tanto, es deseable y necesario conocer las cantidades de material vegetal a utilizar, el

volumen de agua y modo adecuado de preparación (Marinoff et al., 2009). A partir de esta necesidad de mayor información basada en el conocimiento y método científico resulta muy importante la investigación de las plantas medicinales de uso tradicional con el fin de poder avalar sus potenciales aplicaciones o por el contrario desestimar su uso en la medicina casera e informar acerca de sus posibles efectos perjudiciales

En cuanto a la forma en que las personas realizan los preparados con las hojas de pitanga para su posterior consumo y la forma en que son consumidos, los resultados de la entrevista realizada evidencian que la infusión fue la forma de preparación más mencionada. De acuerdo a la literatura, el empleo de agua como disolvente principal se constituye sin duda como la forma más frecuente de procesar gran parte de las denominadas drogas vegetales en la medicina popular (Arrillaga de Maffei, 1969). En menor medida fue mencionada la decocción como forma de preparar las hojas antes de utilizarlas. Sin embargo, la masticación, que constituye otra alternativa de consumo para estas hojas (Tabakián, 2016) no fue indicada por ninguna de las personas que respondieron a nuestro cuestionario. Finalmente, se evidenció que la forma más frecuente de consumir estos preparados es bebiéndolos.

6.2 Recolección de material vegetal y preparación del extracto de hojas de *Eugenia uniflora* a utilizar en los ensayos *in vitro*. Selección de ejemplar de la especie y consideraciones ambientales

El material vegetal necesario para obtener la cantidad necesaria de aceite esencial de pitanga para los ensayos *in vitro* de letalidad y proliferación fue de 7750 g. Este material fue recolectado en dos cosechas, una primera en primavera y otra a fines del verano salteño. Las hojas fueron obtenidas de un único ejemplar de la especie *Eugenia uniflora* seleccionado clonalmente como representante de la población de plantas de pitanga del Uruguay. Este ejemplar se encuentra ubicado en el Jardín de Introducción de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en San Antonio (EFFAS), UdelaR, en Salto, Uruguay (GPS: 31°22'S 57°56'O). La selección de emplear hojas de un ejemplar único se basó en la variabilidad interplantas en el territorio nacional debida a factores climáticos y edafológicos como fue descrito en Materiales y Métodos. Luego de las sucesivas etapas de hidrodestilación el rendimiento promedio de

AE fue de 0.95%, obteniéndose 77,4 g de AE, para ser posteriormente utilizados en ensayos biológicos. Se pudo apreciar que el rendimiento (%) fue mayor en la colecta realizada durante la primavera. El rendimiento en el verano fue menor, variación que tal vez podría ser explicada por las abundantes lluvias que se presentaron durante el verano 2018-2019, las cuales pudieron favorecer una menor concentración de aceites esenciales en las hojas. El AE de pitanga obtenido resultó muy característico ya que no se mantenía unido ni tampoco flotando en el agua de nuestro tubo recolector, el mismo se disponía en fracciones, comportamiento que nos llevó a especular que su densidad aparente era muy similar a la del agua.

Cabe mencionar que, en cada recolección, la cantidad de hojas extraídas fue importante y fue limitada con el fin de preservar la planta (de acuerdo al asesoramiento de la Ing. Agr. Pamela Lombardo). Este es un aspecto ambiental a tener en cuenta al momento de considerar el uso de plantas nativas como fuente de posibles agentes nutracéuticos o farmacológicos ya que la extracción descontrolada de cualquiera de los componentes de la especie vegetal puede tener como consecuencia la desaparición del ejemplar.

Si bien los ensayos incluidos en este estudio fueron hechos utilizando aceite de ésta única planta, a futuro, sería bueno considerar desarrollarlos con aceite esencial extraído de diferentes ejemplares de zonas climáticas similares. Entre los mismos puede existir una variación en los tipos y cantidades de metabolitos presentes en las hojas debido a que estos parámetros pueden verse influenciados por factores edafológicos, climáticos e incluso factores intrínsecos como el genotipo de la planta (Macedo et al., 2010; Cipriano et al., 2021; Figueiredo et al. 2019; da Silva et al. 2017). Es por este motivo es importante mencionar que, si bien no fue como parte del presente proyecto, la caracterización química de los componentes presentes en nuestro aceite esencial fue llevada a cabo por personal del Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). Los resultados de dicho análisis químico mostraron la presencia de 51 compuestos, de los cuales 16 fueron monoterpenos y 35 sesquiterpenos, en la muestra de AE estudiada (Resultados presentados en II Congreso Nacional de Biociencias, 2019).

6.3 Propiedades anticarcinogénicas del aceite esencial de hojas de pitanga: efectos citotóxicos y antiproliferativos en células normales y tumorales de colon humano

Los ensayos realizados en este trabajo se enfocaron en el estudio *in vitro* de las potenciales propiedades anticarcinogénicas del aceite esencial de hojas de *Eugenia uniflora* que resultan la base de la investigación de los efectos quimiopreventivos y terapéuticos de esta planta nativa. Usando como modelo biológico una línea celular humana de colon normal CCD 841 CoN y una línea celular humana tumoral de colon Caco-2 se determinaron a nivel celular los efectos citotóxicos inmediatos y diferidos del tratamiento con el AE, así como los efectos sobre la proliferación celular.

Si bien hay evidencia de investigaciones basadas en las potenciales propiedades de *Eugenia uniflora* como su actividad antimicrobiana (Benfatti et al., 2010; de Souza et al. 2011), antioxidante (Migues et al., 2018) y algunos pocos estudios científicos vinculados específicamente a sus posibles efectos anticarcinogénicos entre los cuales se encuentran su potencial antineoplásico sobre cáncer de cuello uterino (Núñez et al., 2018), algunos estudios sobre los efectos de moléculas específicas presentes y aisladas del AE de *Eugenia uniflora* sobre líneas celulares humanas (Ascari et al., 2021), hasta el momento no hemos hallado estudios acerca de su potencial antineoplásico en cáncer colorrectal que pudiese estar mediado por un efecto citotóxico y/o antiproliferativo, por tanto éste se constituye como un primer reporte acerca del efecto citotóxico del aceite esencial de pitanga sobre células humanas normales y tumorales colónicas.

Los resultados de nuestros ensayos biológicos revelan que el AE de hojas de pitanga produce efectos letales tanto en las células normales como en las tumorales de manera concentración dependiente, como fue evidenciado a partir de las determinaciones de viabilidad celular por el ensayo MTT (Fig. 20 y 21 respectivamente). Una observación más cuidadosa de las curvas de dosis respuesta permite evidenciar que a bajas dosis de AE la respuesta de las células normales y tumorales fue diferente. Se puede observar en la Fig. 20 que la curva de viabilidad de las células CCD 841 CoN presenta un hombro seguido de un decrecimiento exponencial, siendo la viabilidad de un 100% a la dosis más baja testada de AE. En las mismas condiciones experimentales las células tumorales

Caco-2 presentaron un decrecimiento exponencial de pendientes variables según la dosis de AE. En estas células la curva de dosis respuesta no presentó hombro de resistencia y por tanto se evidenció mayor letalidad a bajas dosis de AE (Fig. 21). Para confirmar la letalidad producida por bajas concentraciones de AE en la línea celular tumoral Caco-2 se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de Trypan Blue y el número de células en cultivos tratados durante 32 h con [AE] = 0,66 mg/mL (Fig. 22). Se observó una disminución de la viabilidad celular y concomitantemente del número de células en el cultivo. Ambos resultados nos sugieren que el extracto de hojas de Pitanga podría presentar mayor citotoxicidad a bajas dosis de AE sobre las células tumorales. Este es un resultado importante a profundizar desde el punto de vista de su mecanismo ya que es un desafío importante la búsqueda de terapias contra el cáncer que logren una mayor especificidad sobre las células cancerosas y preservar lo mejor posible las células normales (Lluch, 2016).

La proliferación celular desregulada es una de las características de las células tumorales. Esta proliferación descontrolada se ha identificado como una marca distintiva de los procesos tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011). Por tanto, como un paso para determinar las posibles propiedades quimiopreventivas y/o terapéuticas del AE de pitanga en el CRR y bajo la hipótesis de sus posibles efectos anticarcinogénicos, estudiamos el efecto de este AE en la proliferación celular de las líneas humanas de colon tumoral y normal. En condiciones óptimas de cultivo ambas líneas celulares proliferaron, pero con cinéticas claramente diferentes. El Fig. 23 A y B se presentan las cinéticas de proliferación correspondientes a la línea celular de colon normal CCD841 CoN y tumoral Caco-2, respectivamente. El análisis de los parámetros cinéticos mostró que la proliferación de las células tumorales fue más rápida y alcanzó mayor número de células en fase estacionaria en comparación con las células normales de colon (ver Tabla 4). El estudio de la viabilidad celular medida durante la proliferación celular se presenta en la Fig.24 donde se puede evidenciar una diferencia significativa entre ambas líneas celulares dado que los intervalos de confianza al 95% no se interceptan. Si bien la viabilidad celular se mantuvo alta, por encima del 85% en ambas líneas celulares como es de esperar por estar los cultivos en condiciones óptimas, se observó que las células tumorales

presentaron mayor viabilidad que las normales en el intervalo de tiempo de estudio de la proliferación.

Debido a que el tratamiento con AE de *Eugenia uniflora* disminuye la viabilidad celular de las células tumorales Caco-2 probablemente alterando la capacidad proliferativa de las células, se llevaron a cabo ensayos basados en la cinética de proliferación en presencia de AE de pitanga y se compararon los resultados de la línea tumoral con los obtenidos con las células de colon normales CCD 841 CoN. A través de los estudios de cinética de proliferación y de los cursos temporales de la viabilidad celular mediada por el método de exclusión Trypan Blue se evidenció que la exposición prolongada a una dosis baja de AE (de baja letalidad) produjo inhibición progresiva de la proliferación con disminución de la viabilidad en las células tumorales Caco-2 (Figuras 25 y 27). En el caso de la línea celular normal CCD 841 CoN se observó inhibición completa de la proliferación y pérdida de viabilidad en células (Figura 26). Dicha pérdida de la viabilidad detectada mediante el método de TB sugiere que el mecanismo de acción del AE de pitanga sobre las células podría involucrar la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, hecho importante considerando que una pérdida de la continuidad de la membrana se asocia con eventos de muerte celular (Carranza et al.,2020). Si bien en las células normales de colon el AE de pitanga a una dosis baja de 0,66 mg/mL no presentó efectos letales inmediatos (evidenciados por ensayo MTT), el tratamiento a largo plazo produjo inhibición total de la proliferación sumado a la pérdida de viabilidad lo que nos sugiere que podría contribuir a detener la iniciación de la proliferación y por extensión la iniciación tumoral. En cuanto a las células tumorales, se observó que el AE de hojas de pitanga fue capaz de modificar parámetros celulares relevantes para el crecimiento, expansión y supervivencia de las células de cáncer colorrectal, como son el número máximo de células ($N_{m\acute{a}x}$) alcanzado antes de iniciar la fase de declinación, un aumento del TGC y del T1/2, lo que podría aportar a enlentecer y/o detener la progresión tumoral.

En suma, los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a reconocer la especie *Eugenia uniflora* como una especie vegetal con potencial para la quimiopreención y tratamiento de neoplasias colorrectales. Este hecho resulta muy relevante en la continua búsqueda de compuestos que pudieran poseer actividad anticarcinogénica y con posible aplicación biotecnológica.

Estos resultados contribuyen sin duda a resaltar la importancia de realizar investigación sobre nuestros recursos naturales, profundizar en su conocimiento para fortalecer las medidas para su salvaguarda y en particular estudiar científicamente nuestra flora nativa apoyándonos en el amplio conjunto de conocimientos que se transmiten de generación en generación y que continúan siendo aplicados con múltiples propósitos dentro de nuestra cultura, fundamentalmente aquellos que involucran los procesos de salud-enfermedad.

7. CONCLUSIONES

La especie *Eugenia uniflora* es ampliamente conocida dentro de la cultura uruguaya. La infusión, entre otros preparados hechos a partir de las hojas de esta planta, son empleados tradicionalmente en la intimidad del hogar como tratamiento para múltiples trastornos de la salud incluyendo dolores estomacales, episodios de diarrea, como diurético y antihipertensivo entre algunos otros.

A partir de la producción del aceite esencial de hojas de pitanga y el desarrollo del diseño experimental propuesto para establecer el potencial biológico del extracto de *E. uniflora in vitro* sobre una línea celular tumoral colónica y una línea normal colónica, pudimos determinar que el mismo produce efectos citotóxicos en ambas líneas celulares de una manera concentración dependiente. Sin embargo, a bajas dosis del AE de pitanga la viabilidad de las células normales no se fue alterada mientras que en la línea celular tumoral se evidenció mayor letalidad.

Se pudo concluir también que, la exposición prolongada a bajas dosis del AE mostró alteraciones en la proliferación de ambas líneas celulares. Se evidenció una inhibición progresiva por pérdida de viabilidad en las células tumorales y una inhibición completa de la proliferación por pérdida de viabilidad en las células colónicas normales.

En resumen, el AE de hojas de pitanga produce la muerte de las células tumorales y altera su capacidad de proliferación, afectando la viabilidad celular y contribuyendo posiblemente a la detención de la progresión tumoral. En cuanto a las células normales, los efectos observados sugieren que podría contribuir también a la detención de la iniciación tumoral.

Los resultados de esta investigación respaldan nuestra hipótesis, *Eugenia uniflora* podría ser reconocida como una especie con potencial como agente quimiopreventivo o incluso como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer colorrectal, y refuerza la necesidad de realizar mayor investigación que involucre recursos nativos de uso tradicional como las plantas.

8. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos, podemos compartir las siguientes perspectivas:

- Evaluar los efectos de aceites esenciales obtenidos a partir de más de un ejemplar de *Eugenia uniflora*, planta que posee diversas aplicaciones terapéuticas.
- A futuro, evaluar los efectos del AE de pitanga sobre otros tipos celulares normales y tumorales. De pulmón, por ejemplo, atendiendo a que tradicionalmente los preparados hechos con hojas de pitanga son empleados para tratar múltiples afecciones entre las cuales se encuentran las respiratorias además de las digestivas.
- Realizar estudios experimentales para evaluar posibles efectos genotóxicos producto de la exposición celular al AE de pitanga. Emplear para esto ensayo Cometa y ensayo de Micronúcleos.
- Continuar desarrollando investigación con el fin de identificar y separar las moléculas presentes en el aceite esencial de pitanga responsables de la muerte celular, determinar su mecanismo de acción con el fin de hallar nuevas alternativas para la obtención de nuevos posibles agentes antineoplásicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer (2020). **GLOBOCAN: Incidencia, mortalidad y prevalencia estimadas del cáncer en el 2020**. Lyon, Francia: IARC. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Alvarado, W. (2020). **Prácticas de medicina tradicional y complementaria (MTC) en padres de niños con cáncer en la Institución Casa Magia, Lima, 2019**. Escuela Profesional de Enfermería, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Amat, A., & Vajia, M. (1991). **Plantas Medicinales y etnofarmacología en la Provincia de Misiones (Argentina)**. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 10 (3), 153-159.
- American Cancer Society. (2015). **Métodos complementarios y alternativos para la atención del cáncer**. <https://www.cancer.org/es.html>
- Arrillaga de Maffei, B. (1969). **Plantas Medicinales**. *Nuestra Tierra*, (31), 64p. Montevideo, Uruguay.
- Ascari, J.; Felipe Maciel Pereira, M.; Schaffka, V.M.; Nunes, D.S.; Magalhães, C.G.; Santos, J.S.; Granato, D.; Carmo, M.A.V.d.; Azevedo, L.; Archilha, M.V.L.R.; et al. (2021). **Selina-1,3,7(11)-trien-8-one and Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one from Eugenia uniflora Leaf Essential Oil and Their Cytotoxic Effects on Human Cell Lines**. *Molecules*, 26, 740.
- Asociación Española Contra el Cáncer. (2002). **Cáncer Colorrectal. Una guía práctica**. Madrid, España.
- Auricchio, M.T., & Bacchi, E.M. (2003). **Folhas de Eugenia Uniflora L. (Pitanga)**. *Revisão: Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62 (1), 55-61.
- Avelar-Freitas, B., Almeida, V., Pinto, M., Mourão, F., Massensini, A., Martins-Filho, O., Rocha-Vieira, E. & Brito-Melo, G. (2014). **Trypan blue exclusion assay by flow cytometry**. *Braz J Med Biol Res*; 47 (4): 307-315.
- Barrios, E. et al., Eds. (2020). **V Atlas de Incidencia del cáncer en el Uruguay**. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Montevideo, Uruguay.
- Barrios, E. & Garau, M. (2017). **Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos**. *Anales de la Facultad de Medicina*, 4(1), 7-161.
- Barquero, A. (2007). **Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro**. *Revista QuímicaViva*. Número 2. Año 6. Buenos Aires, Argentina.
- Benfatti, C.S., Cordova, S.M. de, Guedes, A., Magina, M.D.A & Cordova, C.M.M de. (2010). **Actividad antibacteriana in vitro de extractos brutos de especies de Eugenia sp frente a cepas de mollicutes**. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 1(2): 33-39.
- Blanco, I., Cabrera, E. & Llort, G. (2005). **Cáncer colorrectal hereditario**. *Psicooncología*; 2(2)(3): 213-228.
- Calva, M. & Acevedo, M. (2009). **Revisión y actualización general en cáncer colorrectal**. *Anales de Radiología México*. 1:99-115.
- Carranza, C., Ruiz, A., González, C. & Cruz, S. (2020). **Tipos de muerte celular**

y sus implicaciones clínicas. El Residente. 15(3): 97-112.

- Casimiro, C. (2002). **Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos nutricionales y de estilo de vida (segunda de dos partes).** Nutr. Hosp. 17(3): 128-138.
- Castro, M. & Barletta, C. (2018). **Síndrome de Lynch: aspectos genéticos, clínicos y diagnósticos.** Rev. Gastroenterol Perú; 38(3): 265-279.
- Cipriano R.R., Maia B.H.L.N.S & Deschamps C. (2021). **Chemical variability of essential oils of Eugenia uniflora L. genotypes and their antioxidant activity.** An Acad Bras Ciens 93 (1).
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Registro Nacional de Cáncer. (2021). **Resumen estadístico – COLO-RECTO 2013-2017.**
- Correa, C. M. (agosto de 2002). **Protección y promoción de la medicina tradicional. Consecuencias para la salud pública en los países en desarrollo.** Universidad de Buenos Aires: Centro del Sur.
- da Silva, J., Andrade, E., Barreto, L. H., da Silva, N., Ribeiro, A. F., Montenegro, R. C., & Maia, J. (2017). **Chemical Composition of Four Essential Oils of Eugenia from the Brazilian Amazon and Their Cytotoxic and Antioxidant Activity.** Medicines (Basel, Switzerland), 4(3), 51.
- de Souza, L., Damé, L., Hörnke, G., Ziemann, M., Alves, M. & Araújo, M. (2011). **Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá.** Revista Cubana de Plantas Medicinales. 16(4): 324-330.
- Derry, M., Raina, K., Agarwal, R. & Agarwal, C. (2013). **Efectos diferenciales del extracto de semilla de uva contra líneas celulares de cáncer colorrectal humano: el intrincado papel de los receptores de muerte y las mitocondrias.** Cancer letters; 334(1): 69-78.
- Días, D., Urban, S. & Roessner, U. (2012). **A Historical Overview of Natural Products in Drugs Discovery.** Metabolites; 2: 303-336.
- Farnsworth, N., Akerele, O., Bingel, A., Soejarto, D. & Guo, Z. (1989). **Las plantas medicinales en la terapéutica.** Bol Of Sanit Panam, 107(4).
- Figueiredo, P., Pinto, L. C., da Costa, J. S., da Silva, A., Mourão, R., Montenegro, R. C., da Silva, J., & Maia, J. (2019). **Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of Eugenia uniflora L. chemotype-oils from the Amazon.** Journal of ethnopharmacology, 232, 30–38.
- Fogh, J., Wright, W. & Loveless, J. (1977). **Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors.** Journal of the National Cancer Institute. 58(2): 209- 214.
- González, J., dos Santos, J., Fernandes, G., Beckenkamp, A., Buffon, A. & Nejar, A. (2018). **Potencial antineoplásico del extracto crudo acuoso de Eugenia uniflora L. en cáncer de cuello uterino humano.** Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas; 54(2): e17267.
- Guía de práctica clínica. (2018). **Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal.** Asociación Española de Gastroenterología y Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. Madrid.
- Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de prevención del cáncer

- colorrectal. (2009). **Guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal**. Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria, y Centro Cochrane Iberoamericano. Barcelona.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). **Hallmarks of cancer: The Next Generation**. *Cell*, 144(5): 646-674.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015). **Guía para equipos de atención primaria de la salud: Información para la prevención y detección temprana del cáncer colorrectal- 1ª ed.** Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Ji, H-F., Li, X-J. & Zhang, H-Y. (2009). **Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?** *EMBO reports*. 10(3): 194-200.
- Juanbeltz, R., Pérez-Fernández, M., Tirapu, B., Vera, R., de la Cruz, S. & Sarobe, M. (2017). **Complementary medicine use in cancer patients receiving intravenous antineoplastic treatment**. *Farm Hosp*. 41(5): 589-600.
- Keszenman, D. J. & German, P. (2018) Uruguay, Ed. UNDP – **Global Environmental Finance**. Sustainable Development Cluster Bureau for Policy and Programme Support United Nations Development Programme, New York, USA pp.215-219.
- Keszenman, D. J., Salvo, V. A., & Nunes, E. (1992). **Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways**. *Journal of bacteriology*, 174(10), 3125–3132.
- Lima, Y., Guzmán, V., López, Y. & Satchwell, R. (2018). **La medicina tradicional herbolaria en los sistemas de salud convencionales**. *Humanidades Médicas*. 19(1): 201-218.
- Lluch, A. (2016). **Nuevos retos en el tratamiento y la investigación del cáncer de mama**. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. 62 (Supl. extra): 113-115.
- Loli Ponce, R., Sandoval, M., Ramírez, E., Cotrina, E., Casquero, R. & Velázquez, R. (2018). **Vivencias de mujeres que utilizaron medicina tradicional para afrontar efectos de la quimioterapia y radioterapia**. *Rev. Enferm. Herediana*; 11(1): 35-42.
- Lombardo, P. (2015). **Caracterización química y bioactividad de aceites esenciales contra patógenos de los cítricos**. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. p. 129.
- Luca, T., Napoli, E., Privitera, G., Musso, N., Ruberto, G. & Castorina, S. (2020). **Antiproliferative effect and cell cycle alterations induced by *Salvia officinalis* essential oil and its three main components in human colon cancer cell lines**. *Chemistry & Biodiversity*: 17(8).
- Macedo, N., Sandini, T. & Perez, E. (2010). **Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR**. *Biosaúde*, Londrina, v. 12, n. 1 / 2.
- Marinoff, M., Martínez, J. & Urbina, M. (2009). **Precauciones en el empleo de plantas medicinales**. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; 8(3): 184-287.

- Mazzei, E. (Comp.). (2017). **Las sociedades fronterizas: visiones y reflexiones**. Director del Centro de Estudios de la Frontera. Universidad de la República, Uruguay.
- Migues, I., Baenas, N., Gironés- Vilaplana, A., Cesio, M., Heinzen, H. & Morenos, D. (2018). **Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of Eugenia uniflora L. (Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations**. *Foods*. 7(5): 67.
- Ministerio de Salud Pública. (2018). **Cáncer colo-rectal detectado y diagnosticado a tiempo, es curable**. Recuperado de: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/cancer-colo-rectal-detectado-y-diagnosticado-tiempo-es-curable>
- Mossman, T. (1983). **Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays**. *Journal of Immunological Methods*, (65), 55-63.
- Notejane, M., et al. (2018). **Derivados cannábicos para uso medicinal en niños y adolescentes: aportes para un uso responsable y seguro**. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 89(3),187-193.
- Novack Victoria, F., João Lenardão, E., Savegnago, L., Perin, G., Guimarães, R., Alves, D., Padilha da Silva, W., & de Souza de Mott, A. (2012). **Essential oil of the leaves of Eugenia uniflora L.: Antioxidant and antimicrobial properties**. *Food and Chemical Toxicology*. 50(8): 2668-2674.
- Núñez, J. (2018). **Antineoplastic potential of the aqueous crude extract of Eugenia uniflora L. in human cervical cáncer**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(2).
- Organización Mundial de la Salud. (2021). **Cáncer**. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. **Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional**. Ginebra, OPS/OMS, 2002. <http://www.ops.org.bo/textocompleto/pi31763.pdf>
- Parés, D., Pera, M., González, S., Pascual, M. & Blanco, I. (2006). **Poliposis adenomatosa familiar**. *Gastroenterol. Hepatol*. 29(10): 625-635.
- Pérez, A. (2017). **Actividad antitumoral de un extracto de romero (Rosmarinus officinalis L.) en modelos in vitro e in vivo de cáncer de colon**. Universidad Miguel Hernández de Elche, España.
- Queiroz, J., Suzuki, M., Motta, A., Nogueira, J. & Carvalho, E. (2015). **Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como Fitoterápico**. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro; 9(2): 73-159.
- Rayan, A., Raiyn, J. & Falah, M. (2017). **Nature is de best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity**. *PLoS ONE* 12(11): e0187925.
- Red de plantas medicinales de América del Sur. (2005). **Plantas medicinales de América del Sur: Diálogo de saberes para la Sustentabilidad**. Artes Gráficas S.A., Montevideo, Uruguay.

- Rodríguez, E., Aceñolaza, P., Picasso, G., & Gago, J. (2018). ***Plantas del bajo Río Uruguay. Árboles y arbustos***. 1 (1), 310p. CARU. Paysandú, Uruguay.
- Sequeira, A. (2014). ***Especies medicinales y aromáticas usadas en Uruguay***. Hierbas, (12), 15p.
- Simões, C., Mendes, S., Guedes, A., Alberton, M. & Mendes, C. (2010). ***Actividad antibacteriana in vitro de extractos brutos de especies de Eugenia sp frente a cepas de mollicutes***. Revista Pan-Amazónica de Saúde 1(2): 33-39.
- Tabakián, G. (2016). ***Etnobotánica de plantas medicinales en el departamento de Tacuarembó, Uruguay***. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Tabakián, G. (2019). ***Estudio comparativo de plantas medicinales vinculadas a tradiciones indígenas y europeas en Uruguay***. Bonplandia; 28(2): 135-158.
- Tafari, R., Chiesa, G., Caminati, R. & Gaspio, N. (2013). ***Factores de riesgo y determinantes de la salud***. Revista de Salud Pública 17(4): 53-68.
- Thompson, A., Dilworth & Hay, R. (1985). ***Isolation and culture of colonic epithelial cells in serum-free medium***. Journal of tissue culture methods. 9(2): 117- 122.
- Tume-Farfán, L. (2014). ***Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer***. Gaceta Mexicana de Oncología; 13(4): 236-243.
- Vignale, B. & Bissio, L. (2005). ***Selección de frutales nativos en Uruguay***. Agrociencia; 9(1)(2): 35-39.
- Vignale, B., Jolochin, G., Cabrera, D. (2018). ***PITANGA Eugenia Uniflora L.*** PROCISUR. Montevideo, Uruguay.
- Waizel – Bucay, J. (2010). ***Plantas y compuestos importantes para la medicina: los sauces, los salicilatos y la aspirina***. Revista de Fitoterapia; 10(2): 133-145.
- Yadav, K., Singhal, N., Rishi, V., & Yadav, H. (2014). ***Cell Proliferation Assays***. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

10. APÉNDICE 1



2020

Usos tradicionales de hojas de *Eugenia Uniflora*

N.º. de entrevista:

Datos del entrevistado

Identificación:	Edad:
Sexo:	Ocupación:
Lugar de residencia:	Nivel educativo:

- 1) ¿Tiene usted conocimiento acerca del árbol de "Pitanga"? SI – NO
- 2) ¿Sabe Ud. que se llama Eugenia Uniflora? SI - NO
- 3) ¿Conoce usted usos con fines medicinales que se le den a las hojas de Pitanga?
¿Cuáles?

- 4) ¿Ha usado Ud. o su familia el té de Pitanga o usado sus hojas para hacer algún preparado con fines medicinales? ¿Cuales?

- 5) Si contesta SI: ¿Cómo lo ha preparado?

- 6) ¿Cuánto consume del preparado? _____
- 7) ¿Con qué frecuencia lo utiliza? _____
- 8) Si ha preparado: ¿quién le enseñó o de donde obtuvo la receta?

- 9) ¿Cómo lo ha usado (Bebido, en polvo, como pasta, aplicado sobre la piel, mezclado con otro producto, en forma de crema)?

- 10) ¿Padece usted algún tipo de problema digestivo (Inflamación, pólipos, celiaquía, cáncer, acidez (aguras), dolor abdominal, estreñimiento, diarreas, etc.) que le haya motivado a usar las hojas de Pitanga?

Salto, Uruguay

Formulario de entrevista **Usos tradicionales de hojas de *Eugenia uniflora*.**